

主論文の要約

論文題目 Integrated Microfluidic System for On-Chip Measurement of Cellular Mechano-Index (細胞のオンチップ機械的指標計測のための統合マイクロ流体システム)

氏名 中原 康

論文内容の要約

細胞の硬さなどといった機械的な指標はその細胞の特性や状態を示すパラメータとして近年注目されている。例えば卵子はその透明帯のヤング率が細胞周期に応じて変化したり、受精率に関連があるといった報告がある。幹細胞の一種である **Mesenchymal stem cell (MSC)** は、それらが培養された基材の硬さが細胞の持つ反力とその細胞の分化に影響を及ぼすということが報告されている。これらの報告は科学的知見としてだけでなく、体外受精や組織構築などの点において、医療や産業への貢献としても非常に重要である。一方で、当然細胞は生物であるためにその生物学的な状態は時間に応じて変化する、また臓器を構築するためには大量の細胞が必要となるといった観点から、細胞の機械的な指標をハイスループットに計測することが可能で、さらにそこから要求を満たす細胞のみを選別する技術が必要となる。

我々の研究グループでは、マイクロ流体チップにマニピュレータを統合することで、オンチップで細胞の粘弾性を計測可能なロボット統合型マイクロ流体チップの提案を行ってきた。ロボット統合型マイクロ流体チップを用いることで、**AFM** などと比較して、従来よりも高いスループットで計測が可能となることが考えられるが、このマイクロ流体チップ内の細胞の計測部に細胞を搬送させるための技術統合が行われておらず、操作者が手動でシリンジを操作していたため、その高いスループットを実現することが困難であった。そこで本稿では、ロボット統合型マイクロ流体チップの計測システムにオンチップでの細胞操作技術を統合することで、ハイスループットな細胞計測系の構築を行うことを研究の目的とする。

第 2 章では、細胞の機械的指標のタイムラプス計測を行った。上述のように、細胞は生物

であるため、その状態は培養時間に応じて変化する。このため、細胞の培養中における機械的指標変化を計測する必要がある。この評価が、細胞の計測のスループットがどれくらい高くあるべきかを知るために重要になることが予想される。細胞の機械的指標のタイムラプス計測を達成するために、我々はセルキャリアチップを提案した。このマイクロ流体チップ内には、細胞を変形させるためのオンチッププローブとその際の反力を計測するための力センサに加え、チップ内で細胞を搬送するためのメンブレンポンプが統合されている。メンブレンポンプを手で押すことで、細胞がチップ先端より吸引され、計測部に到達する。従来のオンチップでの細胞計測手法とは異なり、外部ポンプとマイクロ流体チップをチューブで接続し、流体制御を行うという工程を必要とせず、これによりマイクロ流体チップ内で細胞を失うことなく、マイクロ流体チップを持ち運びすることが可能である。したがって、このセルキャリアチップを顕微鏡下の機械的指標計測環境とインキュベータ内の培養環境を繰り返し行き来させることで、細胞の機械的指標のタイムラプス計測が可能となる。セルキャリアチップは、ガラス、シリコン、ガラス、ポリジメチルシロキサン (PDMS) からなる 4 層構造を有しており、陽極接合や DeepRIE といった MEMS 加工により作製される。セルキャリアチップ内のオンチッププローブは永久磁石を駆動源に用いた磁気駆動形のもので、同様に永久磁石を搭載したステッピングモータにより駆動する外部ステージの動きに、2 つの永久磁石の吸着力により追従する。プローブの構造に 2 つの折り返し型の微小構造体と 1 つの長方形型の微小構造体を組み合わせることで、プローブ先端の変位量が $73 \mu\text{m}$ までの領域において、外部ステージの変位量に対して非常に高い線形性を持つ駆動を達成した。また、力センサのキャリブレーションを行い、そのばね定数が $5.85 \times 10^{-2} \text{ N/m}$ 、安定性が $0.176 \mu\text{m}$ と計測されたことから、力センサの分解能は $0.010 \mu\text{N}$ と計算された。今回の実験では、計測対象をマウス卵子とし、培養中における透明帯のヤング率の変化を計測した。透明帯のヤング率を計算するにあたり、弾性球殻モデルを適用し、実験値とフィッティングカーブがよく一致していることを確認した。さらに、卵子の透明帯のヤング率のタイムラプス計測から、透明帯のヤング率が培養時間に応じて増加傾向にあることが見られた。これは、卵子の培養時間が長いものほど、透明帯の α -キモトリプシンに対する溶解時間が長くなる傾向があるという報告と類似しており、透明帯のヤング率とその品質に関連があることが予想される。

第 3 章では、細胞の機械的指標のハイスループット計測を目的として、ロボット統合型マイクロ流体チップの計測システムに、振動誘起流れによる細胞搬送技術の統合を行った。このマイクロ流体チップでは、振動誘起流れにより細胞を搬送するため、マイクロ流体チップ内は閉じた環境ではなく開放された環境となる点が特徴である。これにより、従来のマイクロ流体チップに比べ、マイクロ流路へのアクセスが非常に容易になり、細胞を失うことなくチップ内に導入、またチップ内から回収することが可能である。計測システムのコンセプトとしては、シリンジを用いてマイクロ流路へ細胞を導入し、振動誘起流れを用いることでプローブと力センサを有する計測部へと搬送される。そこで細胞の機械的指標

計測を行い、その後チップ内の液体をシリンジで吸引することで、計測された細胞を回収する。このマイクロ流体チップは、ガラス、シリコンの 2 層構造を有しており、セルキャリアチップと同様に MEMS 加工を用いて作製される。マイクロ流体チップ内のプローブは、そのマイクロ流路が開放された環境を有するため、外部ステージとなるステッピングモータに取り付けた治具により直接操作することが可能であり、その位置決め精度は実験により $0.96 \mu\text{m}/\text{step}$ と計測された。作製したマイクロ流体チップを用いて、卵子のマイクロ流路内への導入実験を行い、その成功率は 100 % であった。次に卵子の搬送実験を行い、振動誘起流れを発生させる piezoelectric actuator への印加電圧を制御することで、 $0.3 \mu\text{m}/\text{s}$ から $78 \mu\text{m}/\text{s}$ の速度で卵子が搬送可能であることを確認した。さらに、卵子の機械的指標計測実験を行った。卵子の機械的指標としてはヘルツの接触理論を用いてヤング率を計算した。最後に、計測後の卵子の回収実験を行い、成功率 100 % を達成した。この卵子のチップ内への導入から、搬送、計測、及び回収までの連続した工程を、1 時間の間に 9 個の卵子に対して行うことに成功した。AFM による細胞の計測では一般的に一つの細胞を計測するのに少なくとも一時間弱要することを考慮すると、高いスループットを実現したと言えるが、実用にご貢献するためには、まだまだ低い値であると考えられる。細胞導入や回収を自動化させることでスループットの改善を行うことは可能であると考えられるが、細胞の搬送速度を上げることが難しいなどの点から、このシステムでのスループットを大きく向上させるためには、大きなブレークスルーが必要であると考えられる。

第 4 章では、第 3 章で提案したシステムよりも高いスループットを実現可能なシステムとして、ロボット統合型マイクロ流体チップの計測システムにロボティックシリンジポンプの技術の統合を行った。加えて、マイクロ流体チップ内にソーティング機能を付与し、計測された機械的指標に基づいたソーティングを行うことが可能なシステムを構築した。構築したシステムは、対象となる細胞のローディング、位置制御、ソーティングのために合計 6 つのポンプを搭載し、機械的指標計測のための piezoelectric actuator を 2 つ搭載している。ソーティングまでの手順としては、細胞懸濁液を含んだローディング用のポンプを駆動させることで、1 つの細胞を計測部付近まで搬送し、その後 2 つの位置制御用ポンプを用いて、細胞が計測部中心に到達するように位置制御を行う。さらにその後、piezoelectric actuator を駆動させることで、計測部に配置された一対の力センサプローブを駆動させることで細胞を圧縮し、反力を計測する。この情報から細胞の機械的指標を計算する。そして計算された機械的指標に基づいて、2 つのソーティング用ポンプのうちのどちらかを駆動させることでソーティングを行う。残りの一つのポンプは、計測部に 2 つ以上の細胞が入ってしまった場合やゴミが入ってしまった場合に駆動し、それらを吸引するエラー処理用のポンプとして用いられる。それぞれのポンプと piezoelectric actuator を、画像処理により特定された細胞の位置に基づいて自動制御することで、ハイスループットな計測及びソーティングを行う。実験に使用するマイクロ流体チップは、ガラス、シリコン、ガラスの 3 層構造を有しており、先述の 2 種類のチップと同様に MEMS 加工により作製され

る。このマイクロ流体チップは、力センサプローブを駆動させるために、一部が開放された環境を有している。このため、チップ内に印加された流体は漏れとしてその部分に流れるが、この流れによるせん断力が力センサプローブを動かし、細胞の位置制御が難しくなるという問題が発生する。この問題の解決のため、計測部付近の流体環境のモデル化を行い、このような構造を持つマイクロ流体チップでは、流路内での位置制御には 2 つのポンプを用いることが有効であるという知見を得た。実際に構築したシステムを用いて位置制御の実験を行い、2 秒程度で計測部の中心付近で対象物を静定させることに成功した。また、ソーティングのための実験として、MSC スフェロイドを用いて、ローディング、位置制御、計測、ソーティング用ポンプによる吸引までの連続工程の実験を行った。その結果、スループットとして 3.85 spheroid/ min を達成し、第 3 章のシステムからの大幅なスループットの向上に成功した。今後は、このシステムを用いて細胞の品質の評価を目的とした、細胞の機械的指標に基づくオンチップソーティングに関する実験を行っていく。