

# 博士學位論文

氏名(本籍)	高橋 優輔 (東京都)
学位の種類	博 士 (工 学)
学位記番号	博甲第 151 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
学位論文題目	マイクロ加工を利用した流路における 浮遊細胞の変形・移動挙動に関する研究
論文審査委員	主査 橋本 成広 教授
	副査 鈴木 健司 教授
	〃 伊藤 慎一郎 教授
	〃 今村 保忠 教授
	〃 藤江 裕道 教授
	〃
	〃

工学院大学大学院

マイクロ加工を利用した流路における浮遊細胞の変形・移動挙動に関する研究  
Study on Deformation of Cell in Micromachined Flow Channel

1. 緒論	1
1-1 生体医工学	1
1-2 細胞バイオメカニクス	1
1-2-1 生物細胞	1
1-2-2 幹細胞	2
1-2-3 悪性新生物	3
1-3 細胞分離システム	4
1-4 細胞の力学的特性	5
1-5 マイクロ加工	7
1-6 目的	8
参考文献	

2. マイクロ傾斜溝における細胞の移動挙動	12
2-1. 緒言	12
2-2. 方法	12
2-2-1. 粒子の沈殿速度	12
2-2-2. マイクロ流路デバイス作製	13
2-2-3. 細胞懸濁液作製	16
2-2-4. 流路実験システム	16
2-2-5. 評価方法	18
2-3. 結果	20
2-4. 考察	23
2-5. 結言	29
参考文献	

3 章 円柱間スリットにおける細胞の変形・通過挙動	31
3-1. 細胞種におけるマイクロスリット通過率測定	31
3-1-1. 緒言	31
3-1-2. 方法	31
3-1-2-1. 細胞懸濁液作製	31
3-1-2-2. マイクロ流路デバイス	31
3-1-2-3. 流路システム	34

3-1-2-4. 評価方法	35
3-1-3. 結果	35
3-1-4. 考察	37
3-1-5. 結言	39
3-2. 縦型マイクロスリットによる血中循環がん細胞捕捉の基礎検討	40
3-2-1. 背景	40
3-2-2. 方法	40
3-2-2-1. 細胞懸濁液作製	40
3-2-2-2. マイクロ流路デバイス	40
3-2-2-3. 流路実験	41
3-2-2-4. 評価方法	42
3-2-3. 結果	43
3-2-4. 考察	45
3-2-5. 結言	50
参考文献	
4 章. 平行平板間スリットにおける細胞の変形・通過挙動	
4-1. 背景	52
4-2. 方法	52
4-2-1. 細胞懸濁液作製	52
4-2-2. 横型マイクロスリット	52
4-2-2-1. 横型マイクロスリットの設計	52
4-2-2-2. 横型マイクロスリットの作製	53
4-2-3. 流路実験方法	54
4-2-4. 評価方法	55
4-3. 結果	56
4-4. 考察	60
4-4-1. 4 章の考察	60
4-4-2. 細胞分離システムの提案	65
4-5. 結言	69
参考文献	
5. 結論	71

# 1 章 緒論

## 1-1. 生体医工学

生体医工学とは、医学と工学の複合分野であり、生命現象の調査を行い、病気に対して有効な診断や治療方法を提供する分野である。1970年代には、超音波技術を利用した内臓などの画像診断や、X線CTの発明によって人間の輪切り画像を診断することができるようになった。1980年代には、MRI（Magnetic Resonance Imaging）が発明され、腫瘍部分を正確に診断することができるようになった。また、同年代にはレーザーメスが発明され、切除と止血を同時に行うことができるようになった。1990年代では、結石破碎装置やラパロスコプと内視鏡を組み合わせによって、低侵襲治療機器が発達した。2000年以降は遺伝子解析が行われ、遺伝子診断や細胞工学が盛んに行われるようになった。中でも、2006年には京都大学の山中教授がiPS細胞を発見したことから、細胞を利用した再生医療が注目を集めている。iPS細胞や幹細胞は多様な組織細胞に分化することが可能な細胞である。これらの細胞を目的の組織細胞へ分化させることで、これまで損傷してしまうと自己修復が困難であった組織の再生が期待されている。例えば、スポーツ損傷が多い靱帯や、高齢化等の理由により伴い擦り減ってしまう軟骨などの再生が期待される。他にも、心疾患などの病気の治療にも期待されている。

## 1-2. 細胞バイオメカニクス

細胞バイオメカニクスとは、生物の最小単位である細胞の持つ性質（変形、移動、分裂、分化）について、力学的観点からアプローチする分野である。細胞は周囲の力学環境に反応し、適応することが知られている。例として、骨に存在する骨芽細胞と破骨細胞は周囲の基質（骨）にかかっている力を感知し、少ない体積で荷重に耐えられるように骨の形状を変化させている。また、血管内壁に存在する内皮細胞は常に血流にさらされており、血流方向に配向していることが知られている。また、幹細胞は接着している足場の弾性率を感知して、分化する細胞が決まることが知られている。これらの現象を理解するためには、生体外（*in vitro*）にて、生体内（*in vivo*）環境を模倣する必要がある。そこで用いられるのがマイクロ加工である。マイクロ加工では細胞とよりも小さいスケールで基板形状などを制御することが可能である。このように、細胞と力学環境の関係や細胞と足場形状の関係を調べることは、将来的には再生医療や病理診断に大きく貢献することになる。

### 1-2-1. 生物細胞

動物細胞は図 1-1 に示すように、細胞膜（Cell membrane）、細胞核（Cell nucleus）、細胞骨格（Cytoskeleton）、細胞質（Cytoplasm）で構成されている<sup>[1]</sup>。中でも、細胞骨格はアクチンフィラメント（Actin filament）、中間径フィラメント（Intermediate filament）、微小管（Microtubule）で構成されている。中間径フィラメントはラミンやケラチンなどの異なるたんぱく質成分から構成されており、細胞の剛性を保つ役割を担う。微小管はチューブリン（Tubulin）と呼ばれるたんぱく質から構成される。微小管は細胞の形態を保つ役割を果たすとともに、細胞膜の流動性や膜たんぱ

く質の移動に関与している。アクチンフィラメントは細胞が強い力学刺激を受けることによってストレスファイバー（Stress fiber）を形成する。このようなアクチンフィラメントの発達が細胞局所の力学特性に大きな影響を与えている。細胞の力学特性を調べることで、ラベルフリーの細胞分離システムの作製が試みられている。

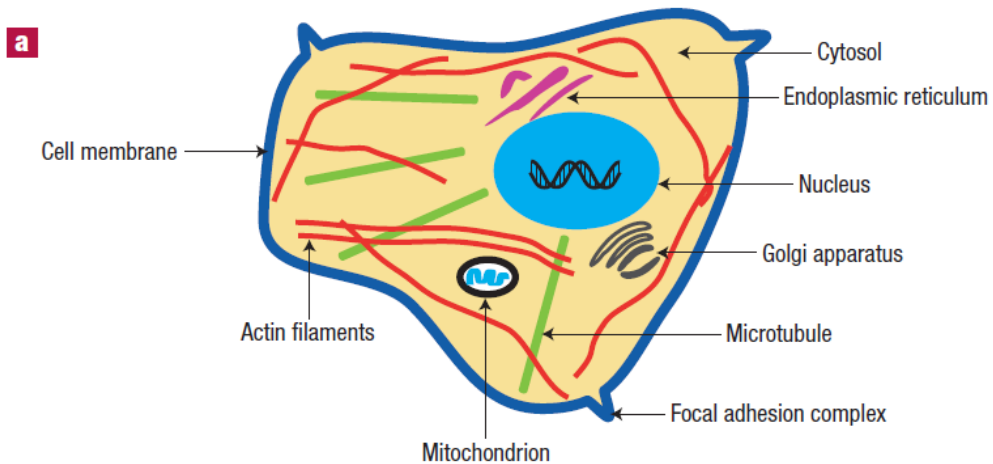


Fig. 1-1 生物細胞の構造<sup>[2]</sup>

### 1-2-2. 幹細胞

幹細胞は多様な組織の細胞へ分化する能力を有する細胞である（図 1-2）。骨髄に存在する間葉系幹細胞（Mesenchymal stem cell）や胚性幹細胞（Embryonic stem cells）、人工多能性幹細胞（induced pluripotent stem cell, iPS cell）といった幹細胞が存在する。これらの細胞を用いることで、これまで治療が困難であった疾患に対して、組織等を再生して治療する再生医療が注目を集めている。特に、iPS 細胞は人工的に細胞の遺伝子を操作することで作製することが可能である。これは、年齢とともに体内から減少していく他の幹細胞と比較すると大きなメリットである。現在では、新薬の開発などで用いられており、iPS 細胞から目的の組織細胞へ分化させた後に、薬剤応答実験などに利用されている。近い将来には、幹細胞を利用した医療行為が行われるようになり、より長く、健康的に過ごせる時代が訪れると思われる。

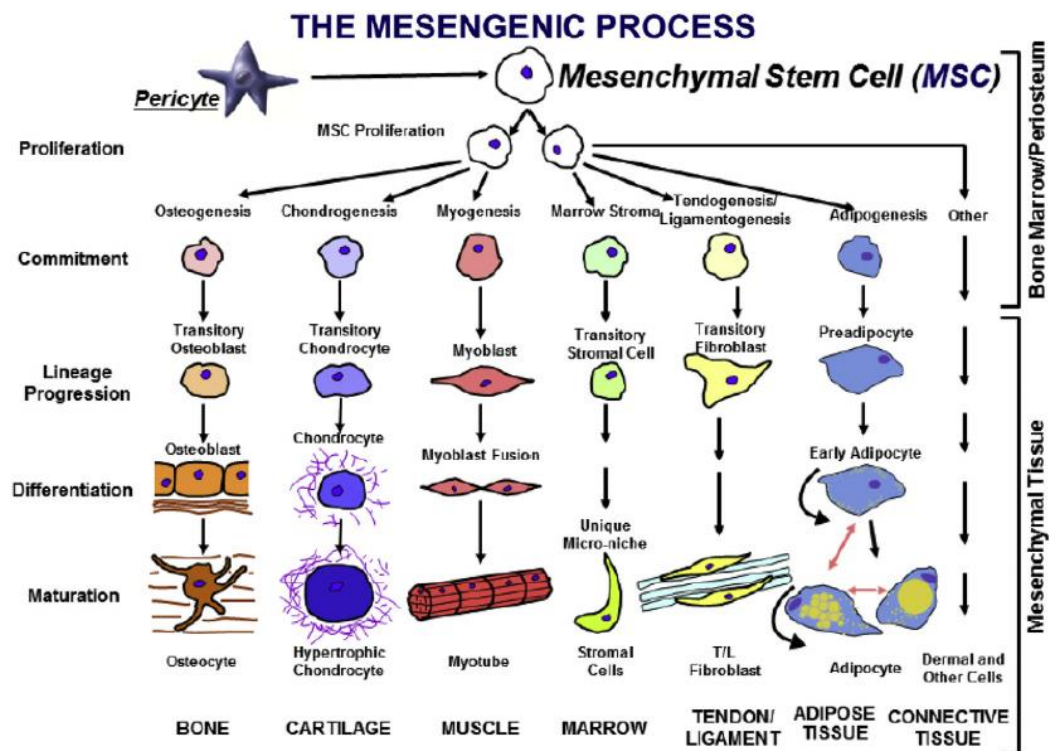


Fig. 1-2 mesengenic process<sup>[3]</sup>.

### 1-2-3. 悪性新生物

悪性新生物とは、悪性腫瘍と同意味で使用されており、細胞が何らかの原因で変異して増殖を続け、周囲の正常な組織を破壊する腫瘍のことを指す。がんや肉腫などがこれに属する。1890 年以降、日本国内において、死亡者のおよそ 3.5 人に 1 人は悪性新生物で死亡しており、最も多い死因である。2015 年の悪性新生物の死亡数を部位別にみると、男性は肺、胃、大腸、肝臓、膵臓の順に高くなっており、女性は大腸、肺、胃、膵臓、乳房の順に高くなっている。また、男女の合計では、肺、大腸、胃、膵臓、肝臓の順に死亡数が高くなっている<sup>[4]</sup>。近年では、悪性新生物は早期発見と適切な治療を行うことにより、死亡率は 5% 未満となる。そのため、悪性新生物の早期発見は重要な課題である。

血中循環がん細胞（CTC: Circulating Tumor Cells）は血液中に含まれているがん細胞を指す言葉である。CTC は 1869 年にオーストリアの医師である Thomas Ashworth により発見されて以降、様々な研究が行われてきた。1889 年にはイギリスの外科医である Stephan Paget によって「種と土壌の仮説（“Seed and soil” theory）」が提唱されている。転移は特定のがん細胞（種）と、種の適合する他の組織（土壌）の応答によって生じるというものである。一般的にがん細胞が血管やリンパ管に侵入すると、免疫細胞によって破壊されてしまう。しかし、ごく一部のがん細胞が免疫細胞の攻撃を避け、新たな臓器へ転移すると言われている（図 1-3）。

健常人では血液中の CTC 濃度が 1 ml 中に数個の割合で存在していると報告されている<sup>[5]</sup>。一方で、がん患者は CTC 濃度が健常人と比べて高く、CTC 濃度が高い患者は全生存期間が短いことが報告されている<sup>[6]</sup>。このように、CTC を調べることは、患者のがんの性質や進行度などを知る手

掛かりとなる．赤血球は直径 8  $\mu\text{m}$ ，白血球は 8 から 15  $\mu\text{m}$ ，CTC は直径 20  $\mu\text{m}$  であることから，流路内部にフィルタを付与したデバイスによって CTC を分離する試みが行われている．

先行研究では，マイクロ流路デバイスや電極を用いて血液中から CTC を分離する方法が報告されている．Joensson らは Deterministic Lateral Displacement (DLD) と呼ばれるマイクロピラーを規則的に配置することで，連続的な流れの違いを利用した細胞分離法を報告している<sup>[7]</sup>．また，Yao らはポンプなどを使用せずに重力のみで細胞を落としていき，最終的に電極によって細胞を分離する方法を報告している<sup>[8]</sup>．Pratt らはマイクロ流路と誘電泳動と呼ばれる不均一電場を用いて細胞を動かす技術を複合した細胞分離デバイスを作製している<sup>[9]</sup>．他にもマイクロデバイスを用いた細胞分離システムの研究は多数行われている<sup>[10] - [13]</sup>．これらの方法は従来のフローサイトメトリと比較しても，コストの低さや操作の簡便さがメリットとして挙げられる．Kim らは multi-obstacle architecture (MOA) フィルタと呼ばれるマイクロスリットを用いて，CTC の捕捉について検討を行っている<sup>[14]</sup>．この実験では，乳がん細胞にマイクロビーズを選択的に接着させることで，乳がん細胞の大きさを選択的に上げている．そのため，大きさの近い白血球とも分離が可能となると報告されている．また，McFaul らはマイクロスリットを作製し，振動流を用いて 2 種類の細胞の機械的特性を測定している<sup>[15]</sup>．このように，マイクロスリットを用いることで，細胞のサイズや弾性率に依存した細胞分離システムを作製することができると考えられる．しかし，形状が複雑になるにつれて，マイクロスリットのメリットである低コストや操作の簡便性が損なわれてしまう可能性がある．

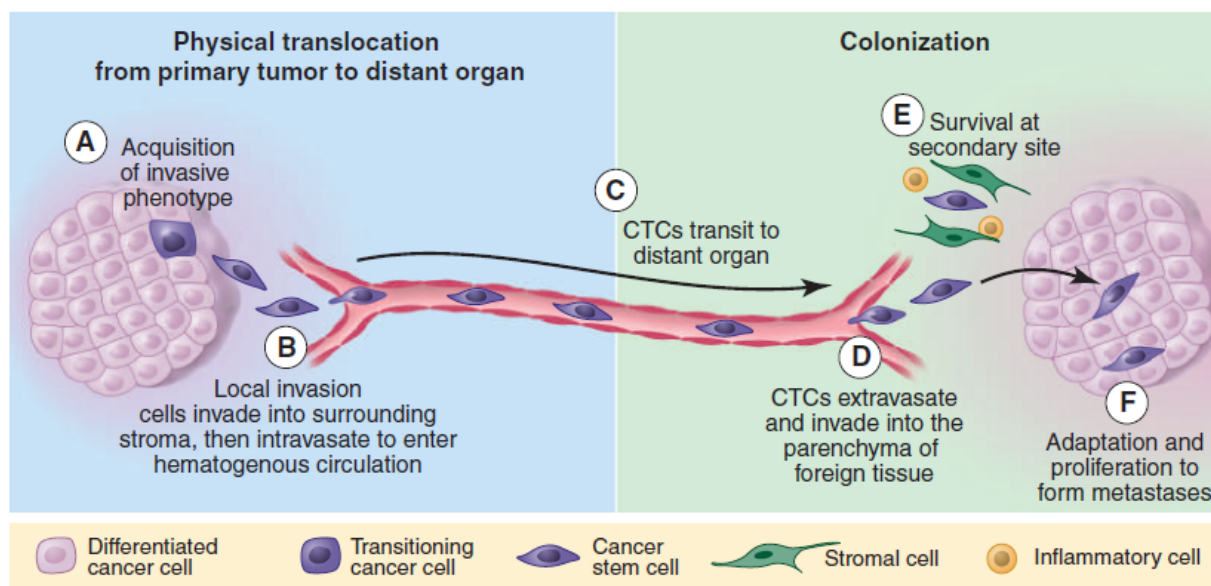


Fig. 1-3 がんの転移メカニズム<sup>[16]</sup>

### 1-3. 細胞分離システム

組織には数種類の細胞が混合しており，目的に応じてサンプルから細胞を分離する必要がある．現在，一般的な細胞分離システムとして使用されているのは，磁気ビーズを使用した MACS (Magnetic-activated cell sorting) と流れやレーザなど多くのシステムを使用した FACS (Fluorescence



activated cell sorting) である。MACS は細胞膜に抗体染色を施し、磁気ビーズを付着させ、強磁場を通過させることで、細胞を分離する方法である。この方法はコストが低く、分離速度も速いといった利点がある。しかし、細胞に磁気ビーズを付着させること、強磁場環境を通過する際に細胞に悪影響がある可能性が懸念されている。他方、FACS は細胞に抗体染色を施し、カメラで検出する。そして、レーザによって電化を付加し、振り分ける装置である (図 1-4)。近年では、検出技術などが向上し、高速度、高精度で細胞を見分けることが可能である。しかし、FACS は非常に高価な装置であること、染色の影響などが懸念されている。

ほかにも、レーザによって細胞を捕捉、選別する方法やマイクロピペットによって細胞を選択的に捕獲する方法などがある。これらの方法は細胞を選択的に分離することが可能であるが、分離速度に問題がある。そこで、マイクロ加工技術によって作製されたデバイスを用いた方法が注目されてきている。

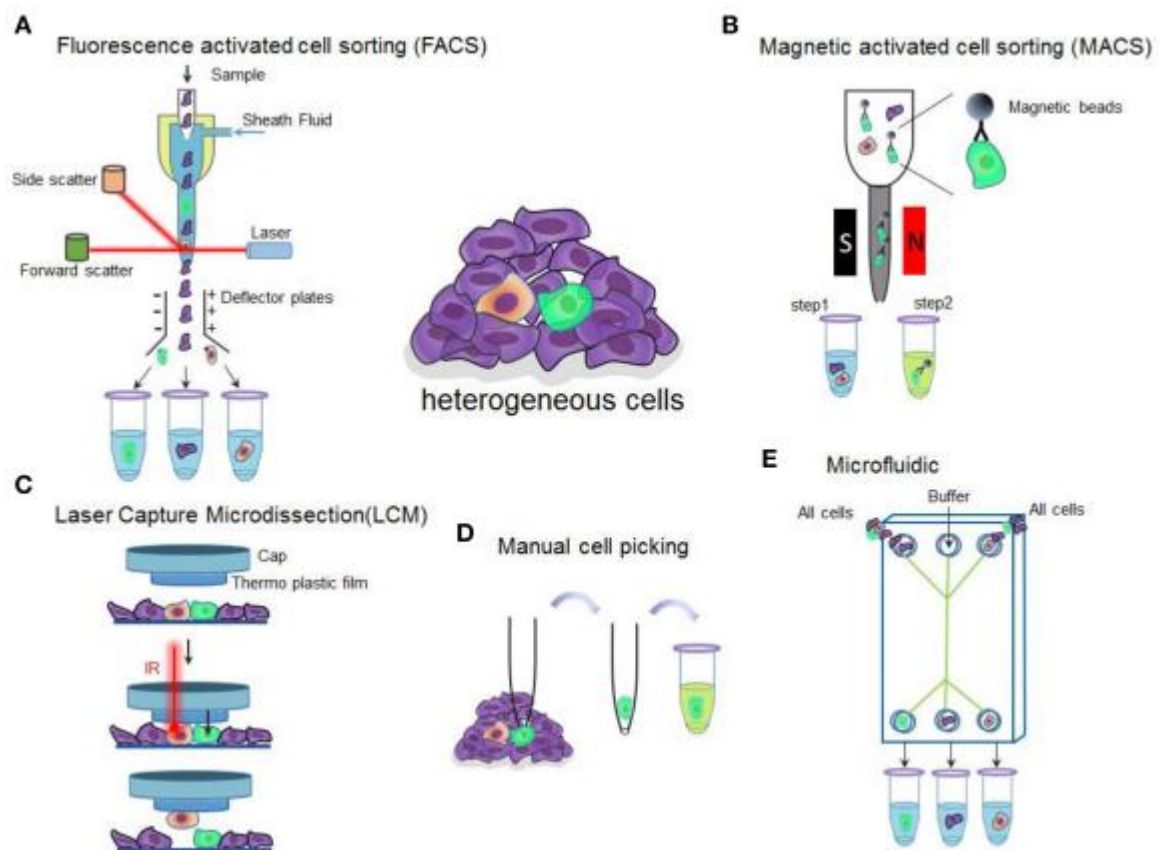


Fig. 1-4 様々な細胞分離システム<sup>[17]</sup>

#### 1-4. 細胞の力学的特性

細胞の力学特性を調べる方法として、マイクロピペット吸引法による細胞の弾性率測定や、マイクロ流路デバイスによる細胞の変形能測定などが挙げられる。赤血球は上記に示した生物細胞とは異なる構造を持つが、老化すると弾性率が高くなることが知られている。弾性率の高い赤血球は脾臓内のフィルタ構造を通過することができず、捕捉され分解されると言われている。赤血球の変形能の低下と変形回数には関係があることが調べられており、赤血球は繰り返し変形を起



こすと、形状回復までの時間が長くなることが報告されている<sup>[18]</sup>。一方で、異常な赤血球の一つである球状赤血球は、通常の赤血球と比較して直径が小さく球状である。また、球状赤血球は通常の赤血球と比べて弾性率が高くなると言われている。一方で、悪性乳房腫瘍細胞（MCF-7）と正常乳房上皮細胞（MCF-10A）の比較を行っている研究が複数存在する。マイクロ加工により作製した流路デバイスを用いることで、2つの細胞の侵入時間（Entry time）を比較している。その結果、MCF-7はMCF-10Aと比べて侵入時間が短いことが報告されている<sup>[19], [20]</sup>。

他にも、細胞の弾性率を測定する方法は多数存在している。光ストレッチャによって細胞を引張り、細胞の弾性率を測定する方法<sup>[21]</sup>、マイクロデバイスにより細胞を挟み込み、変形させて弾性率を測定する方法がある<sup>[22]</sup>。このようなマイクロデバイスはコンタミネーションのリスクの低減や、細胞が生成するECM (Extracellular Matrix) などのたんぱく質の付着などが考えられるため、ディスポーザブルに使用することが必要である。つまり、低コスト化が必要となる。

他方、マイクロ流路デバイスを用いて細胞の質量を測る研究が行われている<sup>[23], [24]</sup>。細胞は培地内に沈殿していき、培養基板底面に接着し、伸展や増殖などの挙動を示す。これらの研究では、密度の異なる2つの流体を用いて、細胞の密度の推定を行っている（図 1-5）。肝がん細胞の密度は1.05～1.15 g/ml、筋芽細胞の密度は1.06 g/ml、線維芽細胞の密度は1.03～1.05 g/mlと報告されている<sup>[25]</sup>。このような細胞の性質を利用して、流路底面に落とし穴を作製して細胞を落とし込む研究が行われている<sup>[26]</sup>（図 1-6）。細胞を落とし穴に落とし込むことで、位置を限定することができ、細胞の操作を行う際に良いアシストとなる。

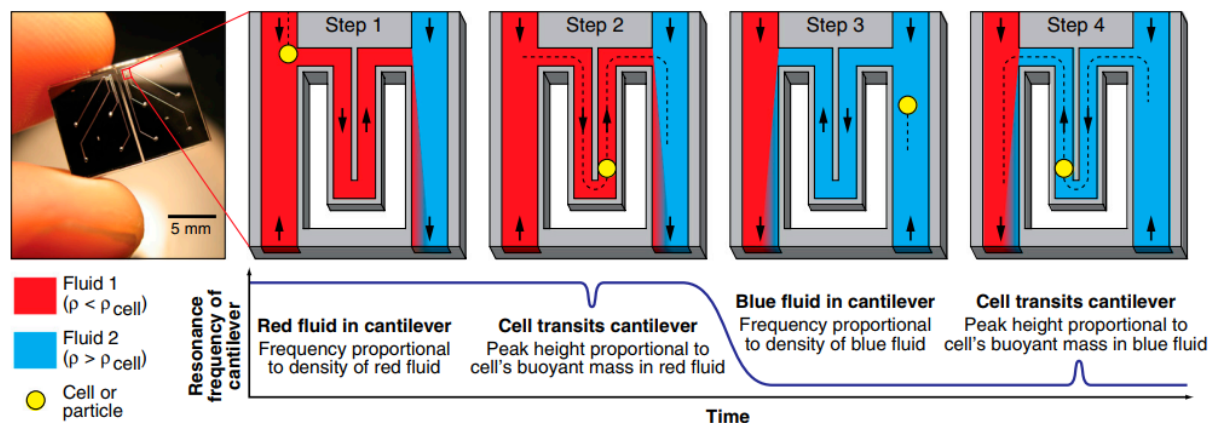


Fig. 1-5 細胞の密度測定デバイス<sup>[23]</sup>。

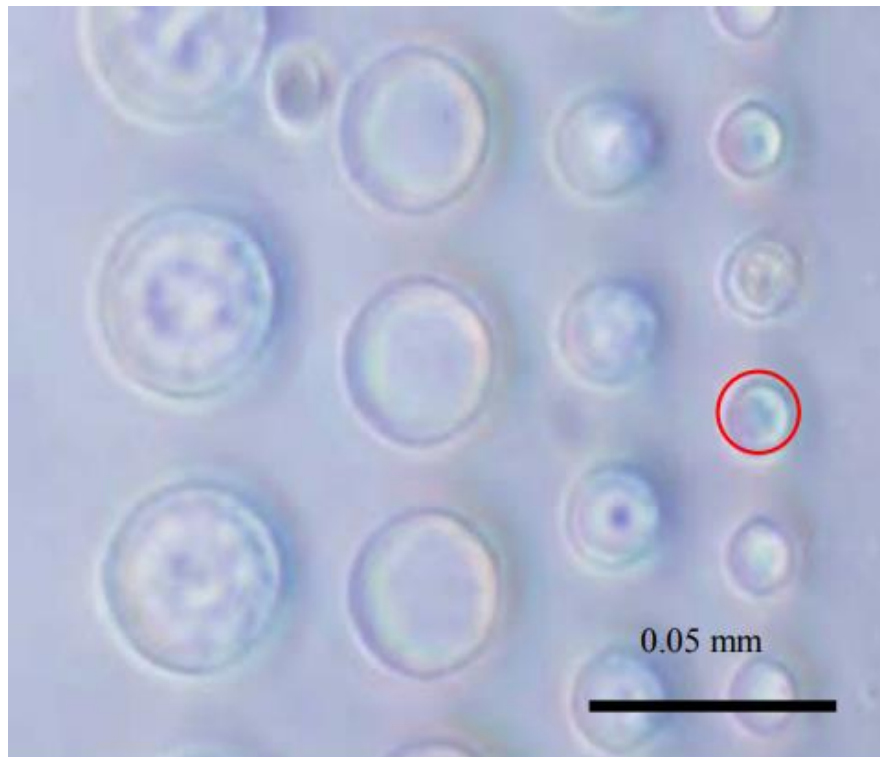


Fig. 1-6 マイクロトラップ．赤丸に細胞がトラップされている<sup>[26]</sup>．

### 1-5. マイクロ加工

マイクロ加工技術はその名の通り、マイクロスケール ( $\times 10^{-6}$ ) で加工する技術である．このスケールで加工するには、トップダウンと呼ばれる方法を用いる．トップダウンとは、大きいものを加工し、小さくする方法を指す．切削加工やフォトリソグラフィがこの方法に当てはまる．

フォトリソグラフィはマイクロ加工技術の一つであり、感光性材料を用いて基板表面に微細加工を施す方法である．また、感光性材料はレジスト剤と呼ばれており、ポジ型とネガ型に分かれる．ポジ型レジスト剤は露光された箇所が除去される材料であり、一方で、ネガ型レジスト剤は露光された箇所が残る材料である (図 1-7)．フォトリソグラフィは一般的に以下の手順で行われる．

#### (1) レジスト剤の塗布 (Coating)

一般的にスピコートによる塗布が行われている．このとき、回転速度やレジスト剤の粘度を変更することで、レジスト剤の膜厚を変更することができる．他にも、ディップ法やスプレー法などがある．

#### (2) プリベーク (Pre-bake)

レジスト剤と基板の接着性の向上と有機溶媒を蒸発させるために行う．

#### (3) 露光 (Exposure)

レジスト剤に光（紫外線）を照射することでパターンを転写する方法である．フォトリソグラフィを用いて行う方法とレーザーによってパターンを直接描画する方法がある．

#### (4) 露光後ベーク（PEB: Post Exposure Bake）

PEB はポジ型とネガ型で意味が異なる．ポジ型では光の干渉などで描画した箇所以外にもパターンが作製されてしまうことがある．これらの影響を除去するために PEB を行う．そのため、ポジ型では必ずしも必要な工程ではない．一方で、ネガ型では、熱を与えることで架橋反応を促進させることが目的である．このとき、PEB が不十分であると基板とレジスト剤の剥離やパターンが現像されないことがある．そのため、ネガ型の場合は必須の工程である．

#### (5) 現像（Develop）

露光したパターンを現像する工程である．それぞれのレジスト剤に合う現像液に浸漬することで、パターンの現像が行える．

#### (6) ハードベーク（Hard Bake）

レジスト剤の耐久性の向上や接着性の向上を目的に行われる．レジスト剤で作製した構造をそのまま使用する場合や、基板のエッチングを行う場合、レジスト剤の耐久性の向上や架橋反応を終了させる必要がある場合に行う．この工程は必ずしも必要ではない．

作製するデバイスによっては、金属薄膜の蒸着やエッチング、リフトオフなどの工程も含まれる．この工程によって、シリコンやガラスなどの基板上に様々な構造体を作製することが可能である．浮遊状態の細胞は直径が約 20  $\mu\text{m}$  であり、フォトリソグラフィで作製することが可能なサブナノスケールからマイクロスケールの表面形状は重要な因子である．また、細胞工学の分野では、フォトリソグラフィで作製した基板上的パターンを PDMS (Polydimethylsiloxane) などの生体適合性の良い樹脂材料へ転写して使用することがある．この樹脂材料は低コストであり、マスターモールドがあれば、同一形状を容易に得ることができるため、ディスプレイ性に優れるといったメリットがある．先行研究では、接着基板にストライプ構造を作製し、そのパターン上で細胞を培養している．その結果、細胞はストライプと同様の方向に伸展し、配向する現象が見られる<sup>[27], [28]</sup>．筋肉などは組織の状態において配向しており、このように細胞を配向させることで、より生体環境に近い状態で生化学分析が可能であると考えられている．このように、マイクロ加工を用いることで、細胞よりも小さな構造を作製することが可能である．また、マイクロ流路デバイスはこれらの工程で作製した基板を組み合わせることで作製される．

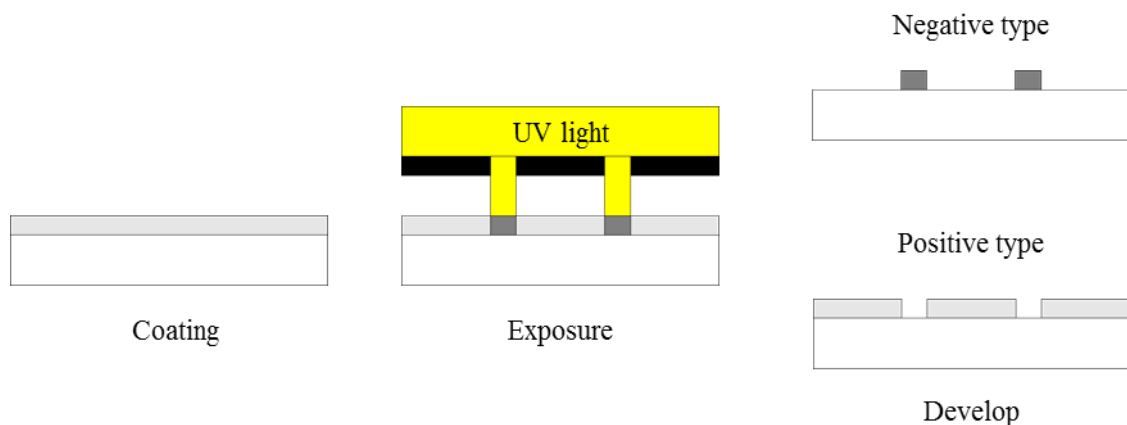


Fig. 1-7 ポジ型・ネガ型レジスト剤によるフォトリソグラフィの工程.

## 1-6. 目的

本研究では、微細加工技術（フォトリソグラフィ）によって、ラベルフリーで細胞を分離するデバイスを作製することが目的である．そのため、浮遊させた培養細胞を用いて、細胞の様々な挙動を計測する．2章では、マイクロ傾斜溝を付与した流路デバイスを作製し、流れてくる細胞がマイクロパターン上でどのような挙動を示すか検討を行う．3章では、円柱間スリットを作製し、2種類の組織由来の細胞の挙動の差について検討を行う．また、円柱間スリットを用いて、がん細胞の捕捉について検討を行う．4章では、高さが細胞よりも小さい約  $10\mu\text{m}$  の平行平板スリットを作製し、細胞がスリットを通過する際の挙動を評価する．各章ごとに実験結果から細胞分離システムへの応用について考察を行う．

## 参考文献

- [1] 平田幸男（訳），解剖学アトラス 原著第10版，2009.
- [2] Bao, G. and Suresh, S., Cell and molecular mechanics of biological materials, Nature Materials, Vol. 2, No. 11 (2003), pp. 715–725.
- [3] Murrell W.D., Anz A.W., Badsha H., Bennett W.F., Boykin R.E., Caplan A.I., Regenerative treatments to enhance orthopedic surgical outcome, PM R. 2015 pp. S41-S52.
- [4] 国立がん研究センターがん情報サービス，[http://ganjoho.jp/reg\\_stat/statistics/stat/survey/mmary.html](http://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/survey/mmary.html)（参照日：2017.10.19）
- [5] Lee, S. -K., Kim, G. -S., Wu, Y., Kim, D. -J., Lu, Y., Kwak, M., Han, L., Hyung, J. -H., Seol, J. -K., Sander, C., Gonzalez, A., Li, J. and Fan, R., Nanowire substrate-based laser scanning cytometry for quantitation of circulating tumor cells, Nano Letters, Vol. 12, No. 6 (2012), pp. 2697–2704.
- [6] Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Allard, W. J., Terstappen, L. W. M. M. and Hayes, D. F., Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, New England Journal

- of Medicine, Vol. 351, No. 8 (2004), pp. 781–791.
- [7] Chaffer, C. L. and Weinberg, R. A., A perspective on cancer cell metastasis, *Science*, Vol. 331, No. 6024 (2011), pp. 1559–1564.
  - [8] Joensson, H. N., Uhlén, M. and Svahn, H. A., Droplet size based separation by deterministic lateral displacement— separating droplets by cell-induced shrinking, *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, Vol. 11, No. 7 (2011), pp. 1305-1310.
  - [9] Yao, B., Luo, G. -A., Feng, X., Wang, W., Chen, L. -X. and Wang, Y. -M., A microfluidic device based on gravity and electric force driving for flow cytometry and fluorescence activated cell sorting, *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, Vol. 4, No. 6 (2004), pp. 603-607.
  - [10] Pratt, E. D., Huang, C., Hawkins, B. G., Gleghorn, J. P. and Kirby, B. J., Rare cell capture in microfluidic devices, *Chemical Engineering Science*, Vol. 66, No. 7 (2011), pp. 1508-1522.
  - [11] Gossett, D. R., Weaver, W. M., Mach, A. J., Hur, S. C., Tse, H. T., Lee, W., Amini, H. and Di Carlo, D., Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 397, No. 8 (2010), pp. 3249-3267.
  - [12] Choi, S., Karp, J. M. and Karnik, R., Cell sorting by deterministic cell rolling, *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, Vol. 12, No. 8 (2012), pp. 1427-1430.
  - [13] Nagraath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A. and Toner, M., Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology, *Nature*, Vol. 450, No. 7173 (2007), pp. 1235-1239.
  - [14] Mohamed, H., McCurdy, L. D., Szarowski, D. H., Duva, S., Turner, J. N. and Caggana, M., Development of a rare cell fractionation device: application for cancer detection, *IEEE Transactions on Nanobioscience*, Vol. 3, No. 4 (2004), pp. 251-256.
  - [15] Kim, M. S., Sim, T. S., Kim, Y. J., Kim, S. S., Jeong, H., Park, J. M., Moon, H. S., Kim, S. I., Gurel, O., Lee, S. S., Lee, J. G. and Park, J. C., SSA-MOA: a novel CTC isolation platform using selective size amplification (SSA) and a multi-obstacle architecture (MOA) filter, *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, Vol. 12, No. 16 (2012), pp. 2874-2880.
  - [16] McFaul, S. M., Lin, B. K. and Ma, H., Cell separation based on size and deformability using microfluidic funnel ratchets, *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, Vol. 12, No. 13 (2012), pp. 2369-2376.
  - [17] Hu P., Zhang W., Xin H. and Glenn Deng, Single Cell Isolation and Analysis, *Front Cell Dev Biol.*, Vol. 4, No. 116 (2016).
  - [18] Sakuma, S., Kuroda, K., Tsai, C. -H. D., Fukui, W., Arai, F. and Kaneko, M., Red blood cell fatigue evaluation based on the close-encountering point between extensibility and recoverability, *Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology*, Vol. 14, No. 6

- (2014), pp. 1135–1141.
- [19] Hou, H. W., Li, Q. S., Lee, G. Y. H., Kumar, A. P., Ong, C. N. and Lim, C. T., Deformability study of breast cancer cells using microfluidics, *Biomedical Microdevices*, Vol. 11, No. 3 (2009), pp. 557–564.
  - [20] Guan, G., Chen, P. C. Y., Peng, W. K., Bhagat, A. A., Ong, C. J. and Han, J., Real-time control of a microfluidic channel for size-independent deformability cytometry, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 22, No. 10 (2012), Article number 105037.
  - [21] Lincoln, B., Erickson, H.M., Schinkinger, S., Wottawah, F., Mitchell, D., Ulvick, S., Bilby, C., Guck, J., Deformability-based flow cytometry, *Cytometry Part A*, Vol. 59, No. 2 (2004), pp. 203-209.
  - [22] Yokokura, T., Nakashima, Y., Yonemoto, Y., Hikichi, Y., Nakanishi, Y., Method for measuring Young's modulus of cells using a cell compression microdevice, *International Journal of Engineering Science*, Vol. 114, No. 1 (2017), pp. 41-48.
  - [23] Grover, W.H., Bryan, A.K., Diez-Silva, M., Suresh, S., Higgins, J.M., Manalis, S.R., Measuring single-cell density, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 108, No. 27 (2011), pp. 10992-10996.
  - [24] Bryan, A.K., Hecht, V.C., Shen, W., Payer, K., Grover, W.H., Manalis, S.R., Measuring single cell mass, volume, and density with dual suspended microchannel resonators, *Lab on a Chip*, Vol. 14, No. 3 (2014), pp. 569-576.
  - [25] Ron M., Rob P., *Cell biology by the numbers* 1 st Edition, (2015), p. 109.
  - [26] Hashimoto, S., Nomoto, R., Shimegi, S., Sato, F., Yasuda, T., Fujie, H., Micro trap for flowing cell, *Proc. WMSCI 2013*, Vol. 1 (2013), pp. 1-6.
  - [27] Wang, P. –Y., Yu, H. –T. and Tsai, W. –B., Modulation of alignment and differentiation of skeletal myoblasts by submicron ridges/grooves surface structure, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 106, No. 2, 1 (2010), pp. 285–294.
  - [28] Altomare, L., Gadegaard, N., Visai, L., Tanzi, M. C. and Farè, S., Biodegradable microgrooved polymeric surfaces obtained by photolithography for skeletal muscle cell orientation and myotube development, *Acta Biomaterialia*, Vol. 6, No. 6 (2010), pp. 1948–1957.

## 2 章 マイクロ傾斜溝における細胞の移動挙動

### 2-1. 緒言

1 章でも述べたように，細胞の物理的特性を調べることは細胞分離技術や細胞の調子などを知る手掛かりとなり得る．2 章では，細胞の密度に着目し，2 種類の細胞がマイクロ傾斜溝から受ける影響について調べることを目的とした．そして，得られた結果をもとに細胞分離システムへの応用について考察した．

### 2-2. 方法

#### 2-2-1. 粒子の沈殿速度

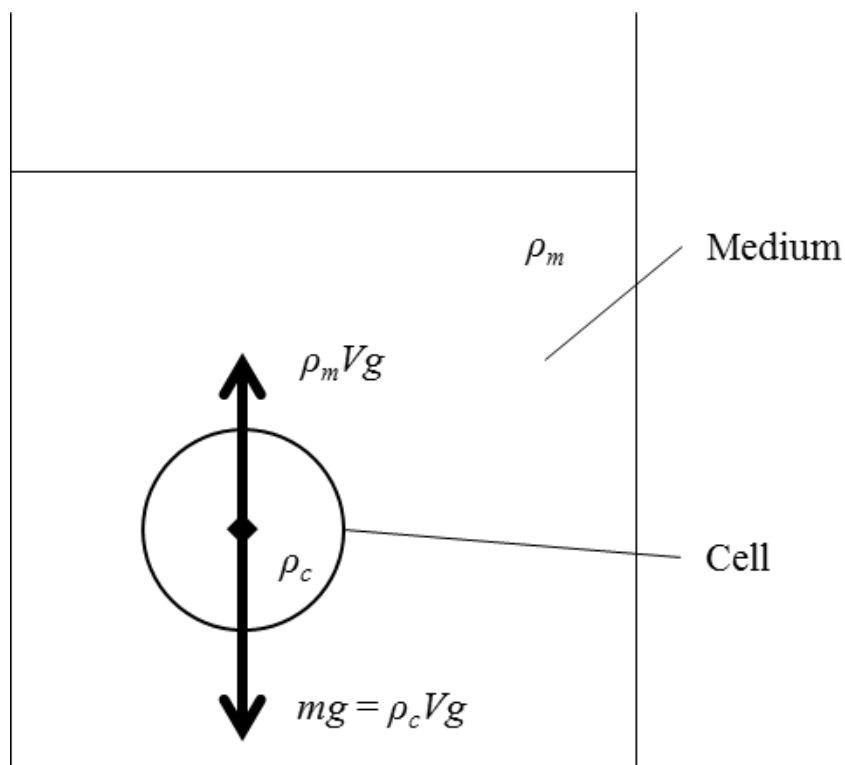


Fig. 2-1 培地中の細胞の力の釣り合い

細胞は基板から剥離すると，内部に存在するアクチンフィラメントなどの細胞骨格に引張られ，球状になる．この状態の細胞の直径はおよそ  $20\ \mu\text{m}$  程度である．浮遊状態の細胞の鉛直方向の力の釣り合いを考えると，図 2-1 に示すように，重力と浮力の 2 つの力が作用しているため，下式で表すことができる．

$$F_y = mg - \rho_m V g$$

ここで， $F_y$  は鉛直方向の力， $m$  は細胞の質量， $g$  は重力加速度， $\rho_m$  は液体の密度， $V$  は細胞の体



積である．質量は密度と体積によって算出できる．よって，式を変形することで，下式が算出できる．

$$F_y = (\rho_c - \rho_m)Vg$$

ここで， $\rho_c$  は細胞の密度である．本研究で使用する液体は培地である．つまり，細胞の沈殿速度は細胞の密度と液体の密度の比によって決まる．細胞が溝内に完全に沈殿してしまうと，抜け出すことが困難となってしまうため，本研究では細胞よりも浅い溝（マイクロ傾斜溝）の影響について検討を行った．

### 2-2-2. マイクロ流路デバイス作製

細胞はほぼ液体で構成されているため，流路デバイスを作製する必要がある．マイクロ流路デバイスは流路形状を持つ PDMS（上部基板）とマイクロ傾斜溝を持つ PDMS 基板（下部基板）の 2 枚を貼り合わせることで作製した．細胞の直径が約  $20\ \mu\text{m}$  であることを考慮して，流路形状は長さ  $25\ \text{mm}$ ，幅  $5\ \text{mm}$ ，高さ  $55\ \mu\text{m}$  の形状で作製した．一方で，マイクロ傾斜溝は流路の中心付近に位置するように設置し，図 2-2 に示すように，長さを  $200\ \mu\text{m}$  と固定し，幅を  $30\ \mu\text{m}$ ， $40\ \mu\text{m}$ ， $50\ \mu\text{m}$  と変化させた．また，深さは  $5\ \mu\text{m}$  とし，細胞の直径よりも小さくし，細胞がマイクロ傾斜溝内に完全に沈殿しないようにした．

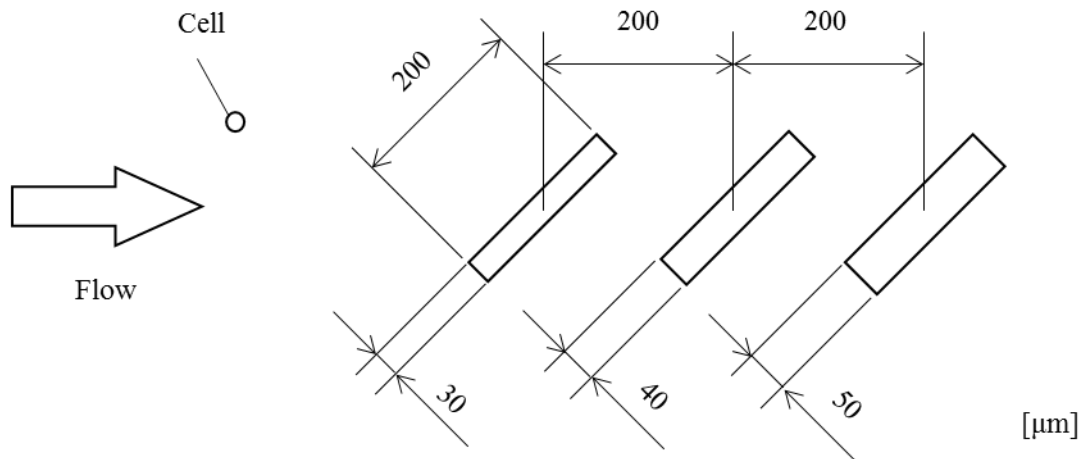


Fig. 2-2 マイクロ傾斜溝の寸法

初めに，上部基板の作製方法を図 2-3 に示す．初めに，半分にカットしたスライドガラスに厚さ  $55\ \mu\text{m}$  のポリイミドテープを貼り付けた．続いて，ガラス上のポリイミドテープをフェムト秒レーザーによって流路形状（ $2\ \text{mm} \times 15\ \text{mm}$ ）にカットした．そして，周りの不要なテープを剥がすことで上部基板用のモールドを作製した．

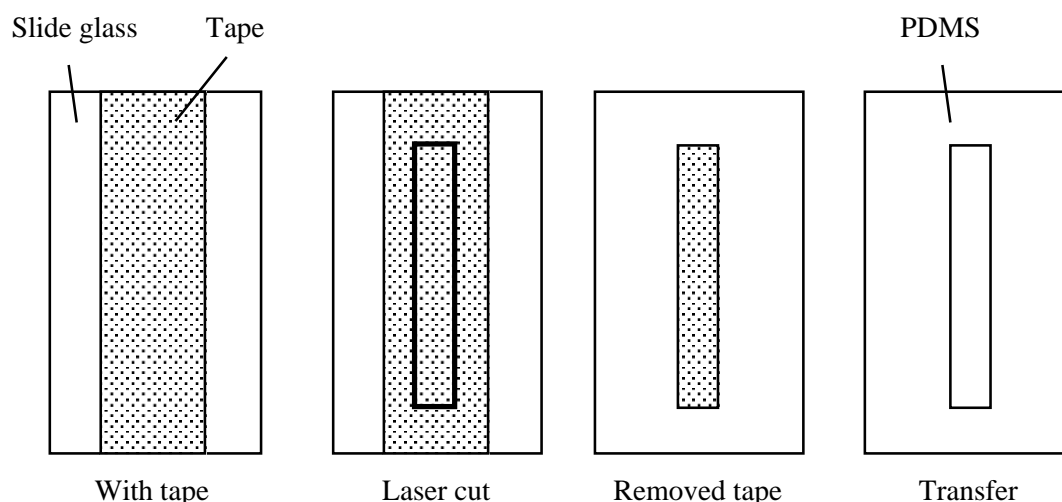


Fig. 2-3 上部基板作製手順

続いて、PDMS に転写するために、ポリイミドテープをスライドガラスの周りに巻きつけ、型を作製した。そして、主剤と硬化剤を体積比 10 : 1 の割合で十分に混合した。続いて、混合した PDMS を真空デシケータ内で十分に脱気後、作製した型に流し込んだ。100℃のオーブンで 1 時間硬化させ、注意深く型から外すことで上部基板を作製した。

次に、下部基板の作製方法を示す。下部基板も上部基板と同様にスライドガラス上にパターンを作製し、PDMS に転写することで作製した。しかし、上部基板よりも精密なパターンが必要であるため、マイクロ加工技術の一つであるフォトリソグラフィによってパターンを作製した。本研究では、チタンを蒸着したスライドガラスにパターン描画、エッチングしたフォトマスクを作製し、ネガ型レジスト材によってマイクロパターンを作製した。

初めに、フォトマスクの作製方法を示す (図 2-4)。半分にカットしたスライドガラスに O<sub>2</sub> プラズマアッシング処理 (100 W, 5 分) を施した。続いて、1 元スパッタリング装置を使用してアッシング面にチタンを 200 nm 成膜した。再度、O<sub>2</sub> プラズマアッシング処理 (100 W, 5 分) を行い、直ちに HMDS を本速 3000 rpm でスピコートした。続いて、OFPR-800 を本速 7000 rpm でスピコートし、95℃のオーブン内で 5 分間ソフトベークした。続いて、レーザ直接描画装置によってパターン形状を描画することで、レジスト材の露光を行った。そして、現像液 (NMD-3, 東京応化工業株式会社) に 5 分間浸漬することで、パターンの現像を行った。現像後、基板を純水でリンスをした後、枚葉式スピンドライヤを用いて乾燥した。そして、金属顕微鏡でパターンの現像を確認した後、エッチングを行った。本研究では、パターンの大きさが小さく、ウェットエッチングではエッチング液が入り込まず、エッチング不足になることがあったため、ドライエッチングを採用した。ドライエッチングは RIE (RIE-10NR, サムコ株式会社) を用いて行った。チタンをエッチングするためにはフッ素系のガスが必要である。そこで、SF<sub>6</sub> と Ar の混合ガスによってドライエッチングを行った。

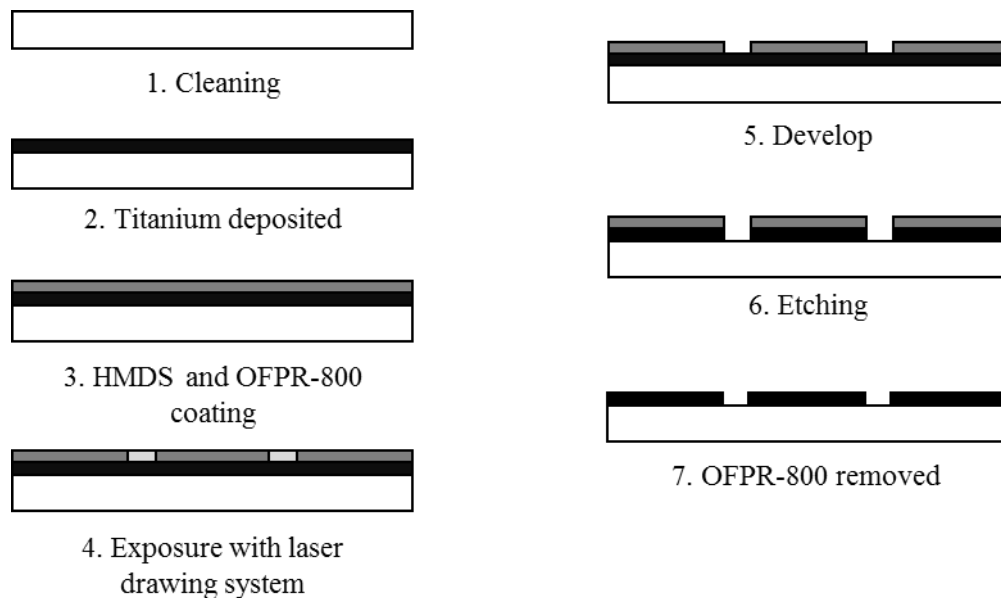


Fig. 2-4 フォトマスク作製手順

次に、下部基板用の型を作製した（図 2-5）．初めに、半分にカットしたスライドガラスに  $O_2$  プラズマアッシング処理を施した．直後に、ネガ型レジスト材（SU-8 5, MicroChem Corp.）を本速 2500 rpm でスピスコートした．そして、95℃のオーブン内で7 分間ソフトベークを行った．ソフトベーク後、上記で作製したフォトマスクを SU-8 面に設置し、マスクアライナによってパターンの露光を行った．このときの露光は Dose 量を  $365 \text{ mJ/cm}^2$  とした．そして、露光後ベークを 120℃のオーブン内で7 分間行った．露光後ベーク後、現像液（SU-8 Developer, MicroChem Corp.）に浸漬し、攪拌を行いながら、現像を行った．現像後、IPA、純水の順にリンスし、枚葉式スピンドライヤによって乾燥した．

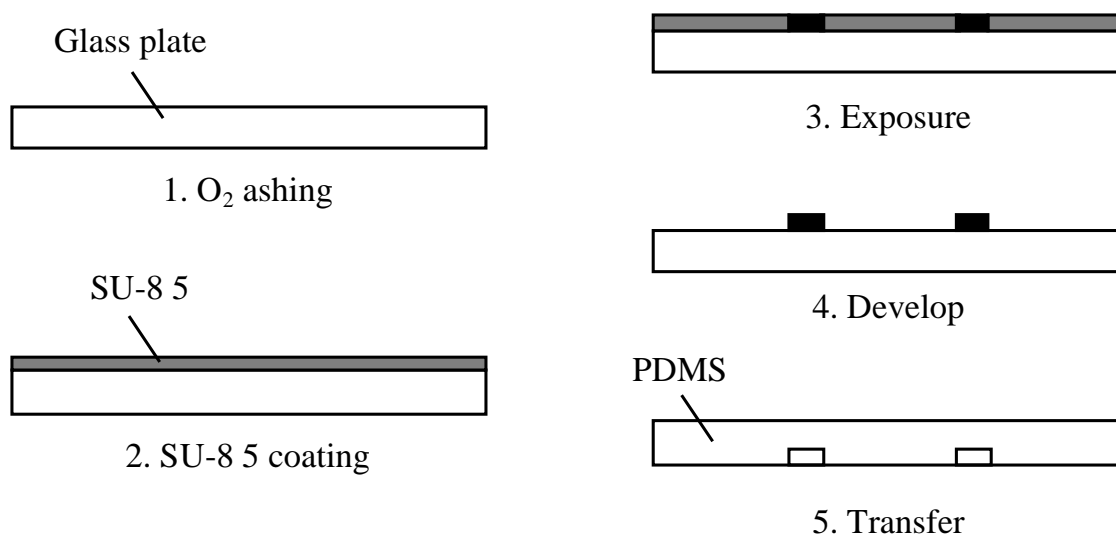


Fig. 2-5 下部基板作製手順

下部基板の PDMS は上部基板と同様の手順でパターン転写を行った。つまり、主剤と硬化剤を体積比 10:1 で十分に混合し、PDMS を十分に脱気した後、ポリイミドテープを巻いた型に 2 ml 流し込こんだ。そして、95℃のオーブン内で 1 時間焼結を行い、注意深く基板から剥離することで、下部基板を作製した。剥離後、PDMS の周りにバリが存在しており、バリによって基板同士の接着が不十分となり、リークの原因となる。そのため、周りのバリをカットした。

下部基板のマイクロパターンはとても小さく、肉眼で観察することは困難である。そのため、顕微鏡で観察しつつ、図 2-6 のようにパターンの位置と方向をマーキングした。そして、上部基板と下部基板を O<sub>2</sub> プラズマアッシング (50 W, 30 秒) を行い、注意深く貼り合わせることで、マイクロ流路デバイスを作製した。この時、プラズマ処理を行うことで、接着が強固となる。

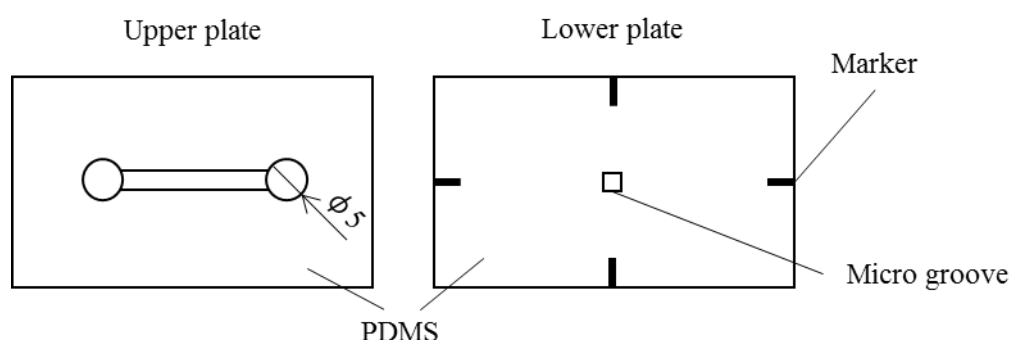


Fig. 2-6 上部基板と下部基板

### 2-2-3. 細胞懸濁液作製

本研究では、2 種類の組織由来の細胞株を用いて実験を行った。使用した細胞はマウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) とマウス肝がん由来がん細胞 (Hepa1-6) である。全ての細胞は、継代数 10 以下で実験に使用した。それぞれの細胞をディッシュ内で培養した。使用した培地は D-MEM にウシ胎児血清 (FBS) と抗生物質 (P/S) をそれぞれ 10%, 1% 添加した培地を使用した。サブコンフルエントまで増殖したところで、トリプシン EDTA 処理によって基板から剥離した。細胞剥離後、トリプシン EDTA の効果を止めるため、かつ、細胞懸濁液の濃度を薄めるために培地を加えた。

### 2-2-4. 流路実験システム

流路実験システムは図 2-7 に示すように、細胞を観察するための倒立型位相差顕微鏡、細胞の挙動を撮影するためのデジタルカメラ、マイクロ流路デバイスで構成されている。倒立型位相差顕微鏡の接眼レンズ部分にカメラスタンドを用いてデジタルカメラを設置した。細胞懸濁液はマイクロピペットによって体積を一定とし、初期水頭差を 30 Pa として実験を行った。

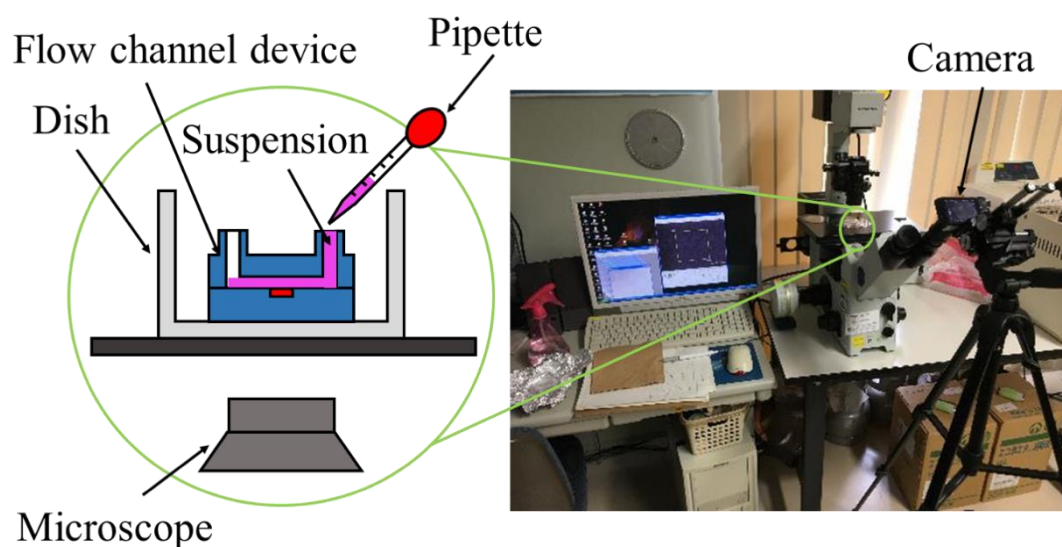


Fig. 2-7 細胞懸濁液導入方法と流路実験システム

PDMS は純水の接触角が約 100 度を示す疎水性の材料であるため、このままでは流路内部に流体が進入することがなく、実験に使用することはできない。そこで、流路実験の直前に流路デバイスに  $O_2$  プラズマ (100 W, 1 分) を照射し、マイクロ流路デバイスを親水化処理した。  $O_2$  プラズマ処理後の接触角は計測することが困難なほど親水性を示す。  $O_2$  プラズマ処理前後の PDMS の純水の接触角を図 2-8 に示す。親水化処理直後にリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を満たし、内部の親水性を保持した。

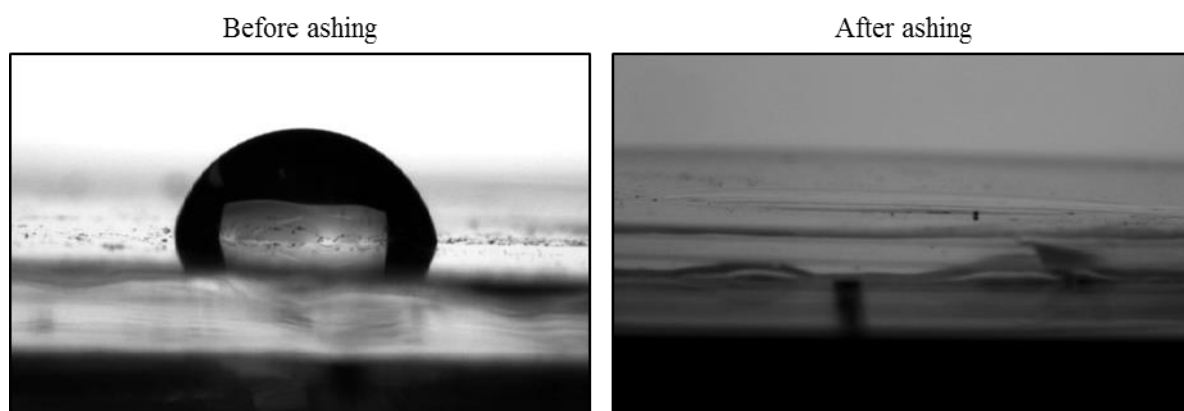


Fig. 2-8 プラズマ処理前後の PDMS と純水の接触角. 左: プラズマ処理前. 右: プラズマ処理後.

本研究では、マイクロ流路デバイスの入口と出口の水頭差を利用して内部に細胞を流した。マイクロ流路デバイスの入口と出口の穴の径は決まっているため、細胞懸濁液の体積によって水頭差を決めることができる。

$$\Delta h = \frac{V}{\frac{1}{4}\pi D^2}$$

ここで、 $\Delta h$  は入口と出口の水頭差、 $V$  は注入する懸濁液の体積、 $D$  は穴の直径である。また、入口と出口の圧力差は水頭差を用いて表すことができる。

$$\Delta P = \rho_m g \Delta h$$

ここで、 $\Delta P$  は圧力差、 $\rho_m$  は培地の密度、 $g$  は重力加速度である。培地と PBS の密度はほぼ純水と同等である。一方で、細胞は培地内で沈殿し、基板に接着するため、培地よりも密度が高いことがわかる。一方で、流量と圧力差には以下の関係がある。

$$\Delta P = RQ$$

ここで、 $R$  は流路抵抗、 $Q$  は流量である。 $R$  は流路の形状などから決まる定数である。つまり、本実験では、時々刻々と流量が低下していく実験系となっている。

#### 2-2-5. 評価方法

細胞がマイクロ傾斜溝上を通過している際に沈殿すると考えられるため、細胞の速度は重要な因子である。つまり、図 2-9 に示すように、細胞の速度が大きいときはマイクロ傾斜溝への沈殿距離が小さいため、マイクロ傾斜溝の影響が小さくなる。逆に、細胞の速度が遅いときはマイクロ傾斜溝への沈殿距離が大きくなるため、マイクロ傾斜溝の影響が大きくなると予想される。本実験で採用している水頭差を使用した方法は時間変化とともに水頭差が小さくなるため、細胞の速度も時間変化によって変化する。つまり、1 度の実験で様々な速度の細胞の挙動を解析することが可能である。

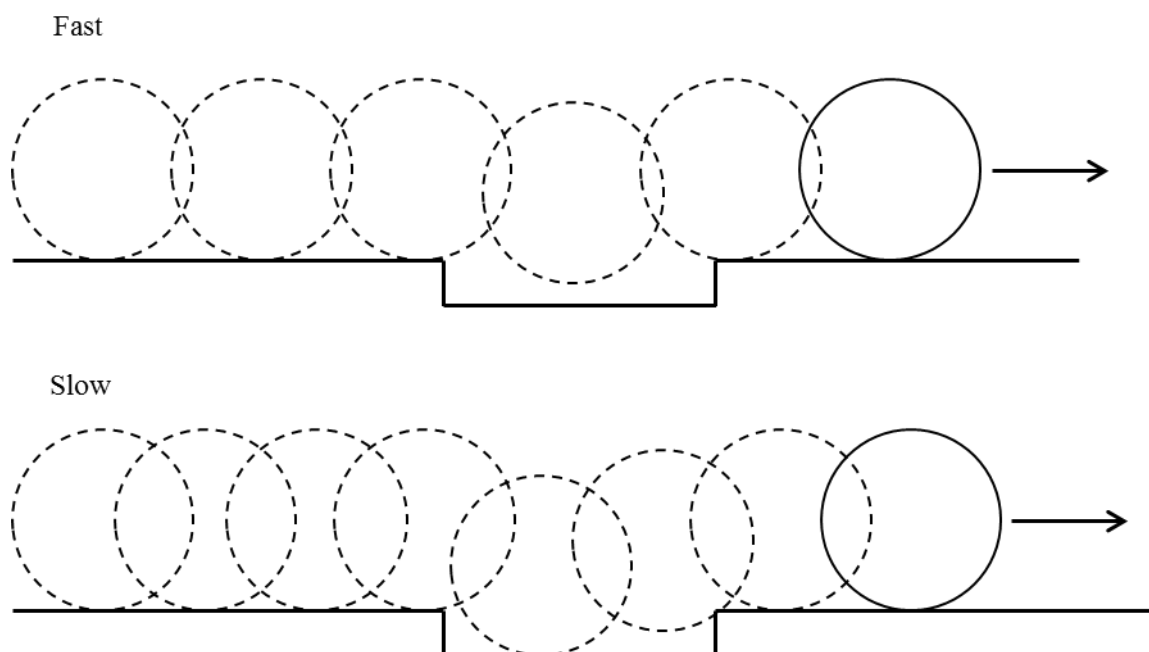


Fig. 2-9 速度における細胞のマイクロ傾斜溝への沈殿の違い. 1 つずつの丸が細胞の軌跡を示す. 矢印は細胞の移動方向を示す.

撮影した動画から細胞の流れ方向の速度は動作解析ソフトウェア (kinovea) を用いて細胞をトレースすることで, 1 フレーム毎の細胞の移動距離を算出した. 実験に使用しているデジタルカメラのフレームレートは 30 fps であるため, 1 フレーム毎の細胞の速度を算出することが可能である.

続いて, マイクロ傾斜溝上の細胞の挙動変化について検討を行った. 細胞の挙動変化は図 2-10 に示すように, 主流方向と垂直方向の移動距離 (垂直移動量) を用いて検討を行った. 垂直移動量が大きい細胞はマイクロ傾斜溝の影響を大きく受けていると考えられる. 垂直移動量は上記でトレースした細胞の軌跡を用いて検討した.



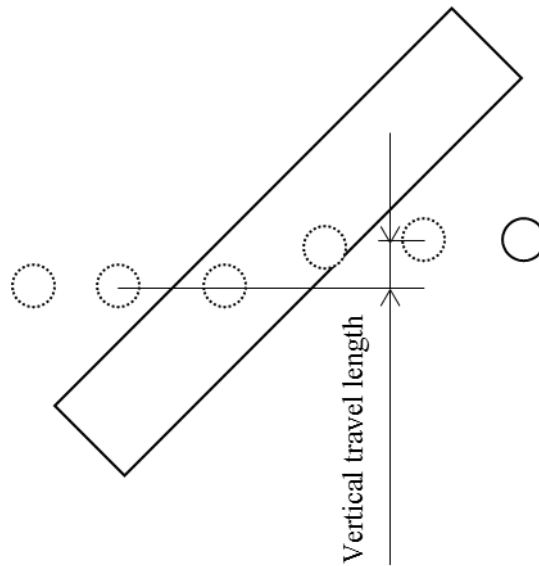


Fig. 2-10 細胞の垂直移動量

### 2-3. 結果

初めに、各時間における細胞の速度について示す (図 2-11). 時間経過とともに細胞の速度が減少することが確認できた. また、速度減少の変化量についても時間経過とともに減少した.

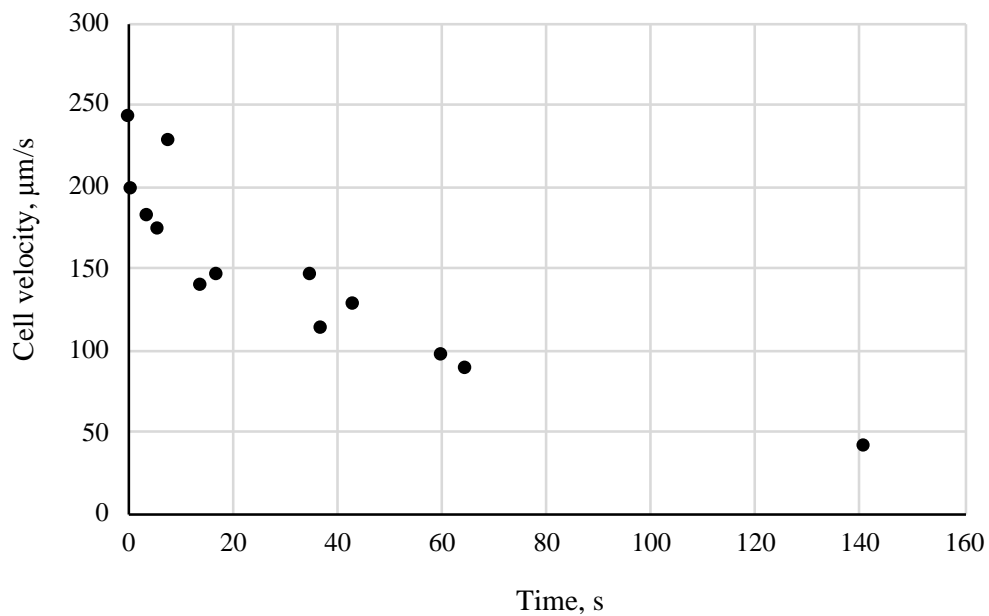


Fig. 2-11 時間経過による細胞の速度変化.

細胞の直径を測定した結果を示す (図 2-12). MC3T3-1 の直径の平均は約  $16.2 \mu\text{m}$  であり, Hepa1-6 の直径の平均は  $15.4 \mu\text{m}$  であった. これらの細胞間に有意な差は認められなかった.

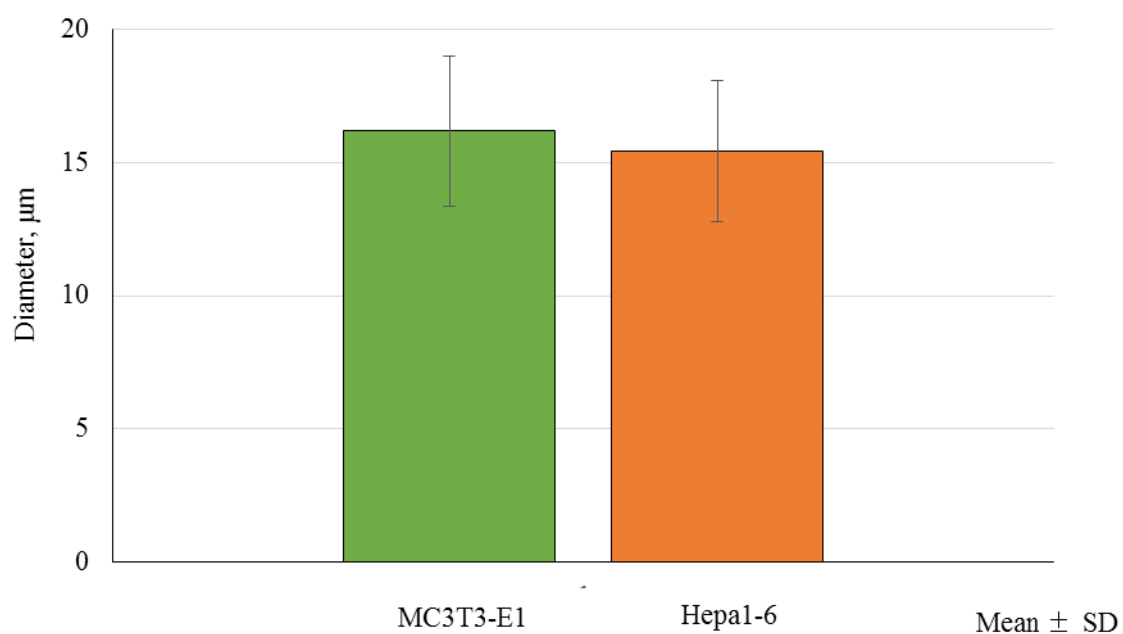


Fig. 2-12 細胞直径計測結果. 白 : MC3T3-E1, 灰 : Hepa1-6.

続いて、細胞の面積と垂直移動量の関係を示す（図 2-13）. MC3T3-E1 と Hepa1-6 とともに細胞の面積と垂直移動量に相関は見られなかった.

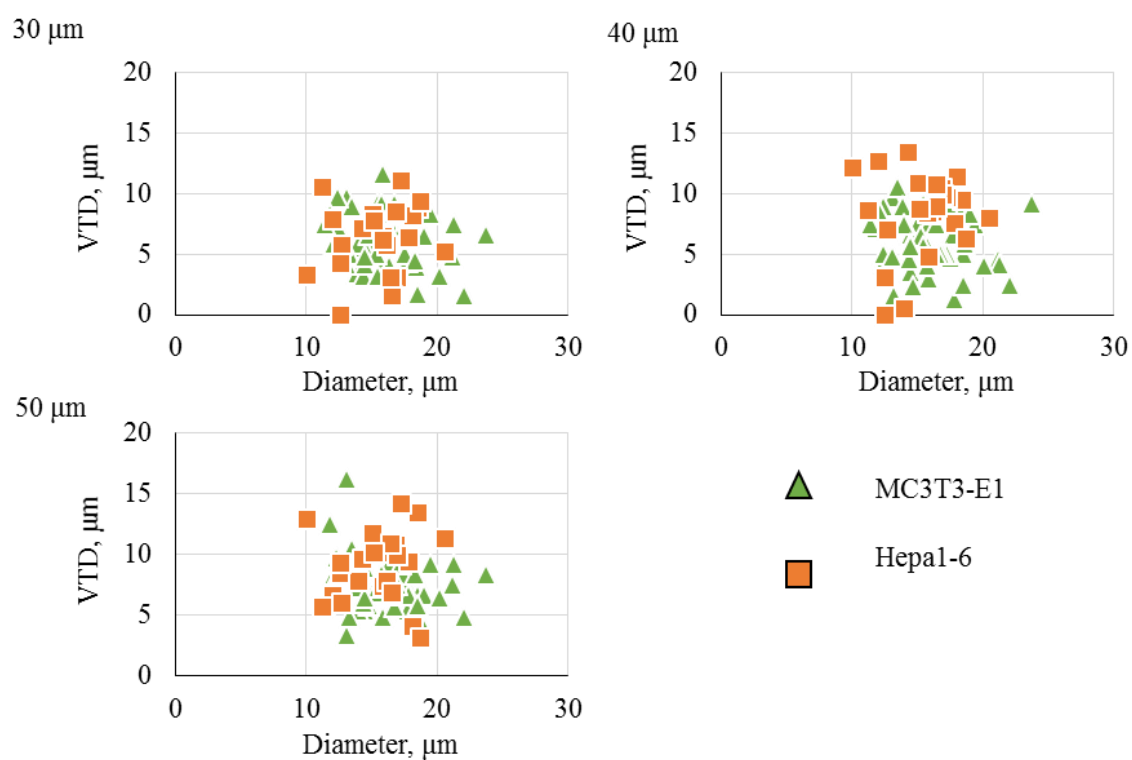


Fig. 2-13 細胞の直径と垂直移動量の関係. 三角 : MC3T3-E1, 四角 : Hepa1-6.

細胞の垂直移動量の結果を示す (図 2-14). 両細胞とも速度が高いと垂直移動量が減少する傾向が見られた. MC3T3-E1 は高速度でマイクロ傾斜溝を通過した細胞が少なかった.

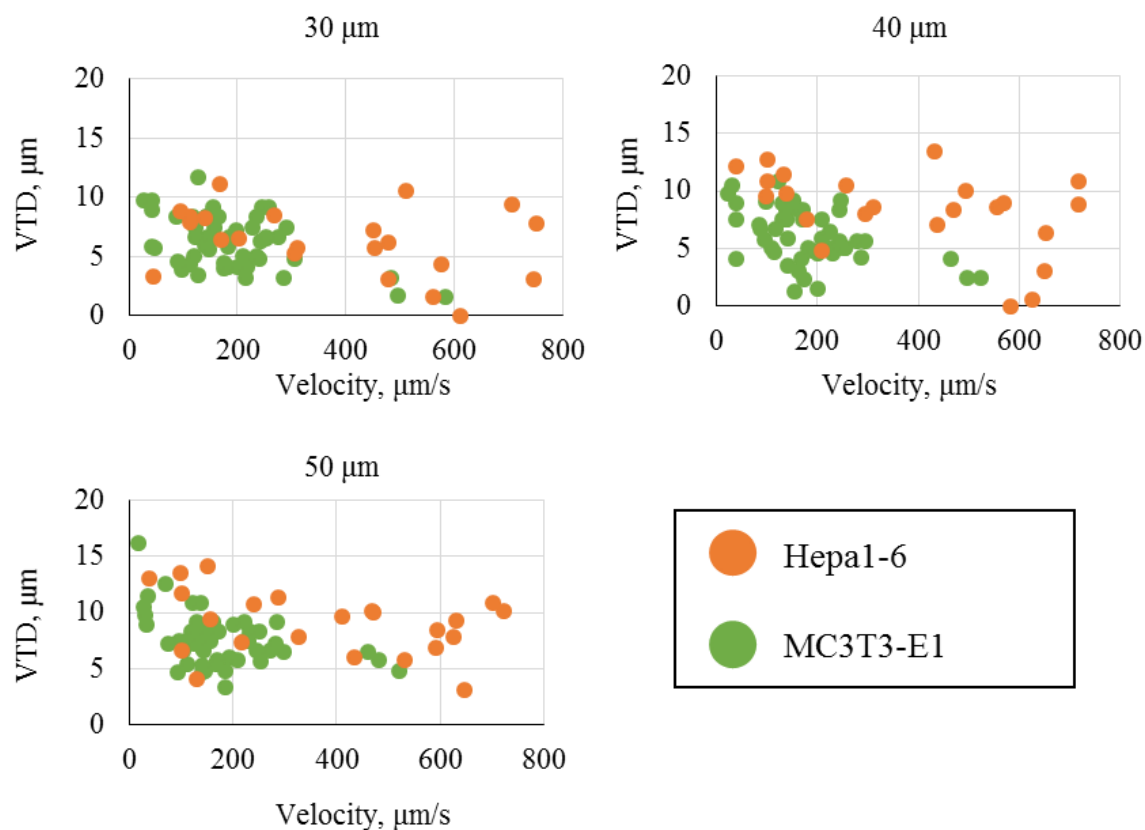


Fig. 2-14 細胞の速度と流れ垂直方向移動量の関係. 三角 : MC3T3-E1, 四角 : Hepa1-6.

続いて, 細胞の速度が 300  $\mu\text{m/s}$  以下の細胞における垂直移動量をまとめた結果を図 2-15 に示す. MC3T3-E1 はほぼ同等の値を示したが, Hepa1-6 はマイクロ傾斜溝の幅が広くなるにつれて, 垂直移動量が増加する傾向にあった. また, 両細胞の垂直移動量を比較すると, 30  $\mu\text{m}$  の幅では, 細胞間に有意差は認められなかったが, 40  $\mu\text{m}$  と 50  $\mu\text{m}$  の幅において, 有意な差が認められた.

※速度300 μm/s以下

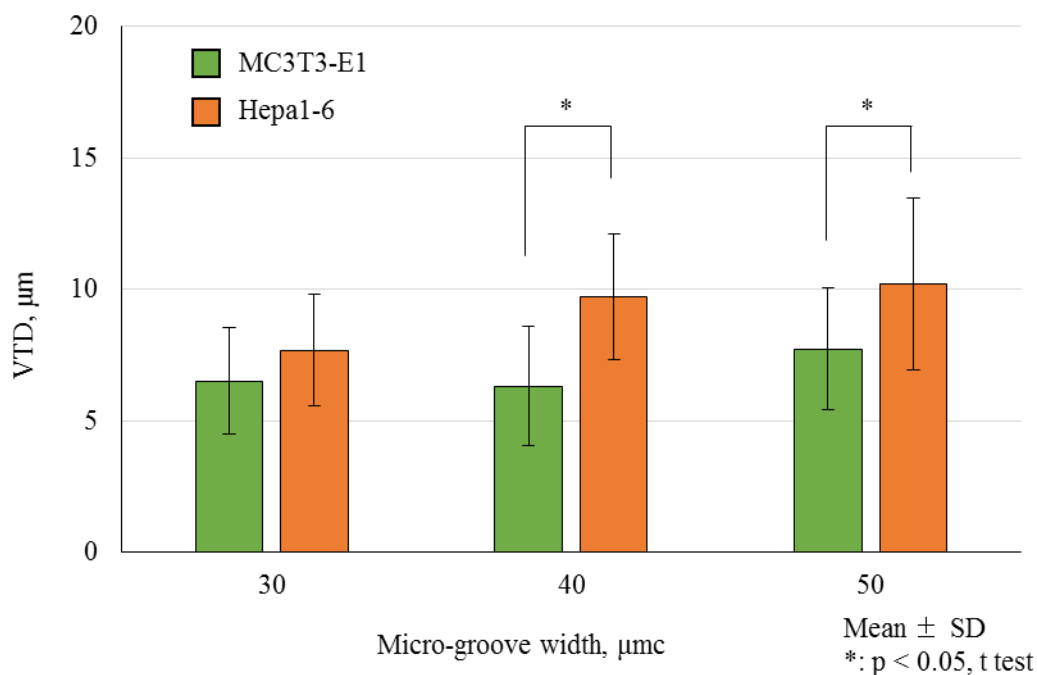


Fig. 2-15 細胞の速度が 300 μm/s 以下の時の細胞種類と流れ垂直方向移動量の関係。白：MC3T3-E1, 灰：Hepa1-6.

## 2-4. 考察

本研究では、細胞の密度によってマイクロ傾斜溝の影響が異なると仮説を立てた。生物細胞の直径よりも浅い溝を作製し、2種類の組織由来の細胞株を使用して実験を行ったところ、マイクロ傾斜溝の幅が広くなると、垂直移動量が大きくなるという結果が得られた。

マイクロ傾斜溝の縁の形状は細胞が抜け出す際に影響を及ぼす可能性がある。本研究で型に使用した SU-8 は光の透過性が高く、鋭いエッジが得られる材料である。また、転写に使用している材料はナノレベルで転写することが可能な材料であるため、エッジの形状も正確に転写されていると考えられる。

本研究では、マイクロ傾斜溝を作製した流路デバイスを作製した。マイクロ傾斜溝がある事で、流れにどのような影響があるかを考える必要がある。マイクロ流路デバイスの流れは高さが幅よりも非常に小さいため、高さに依存した流れとなる。一方で、マイクロ流路デバイス内のレイノルズ数は以下の式で表す事ができる。

$$Re = \frac{UL}{\nu}$$

ここで、 $U$  は代表速度、 $L$  は代表長さ、 $\nu$  は流体の動粘度である。培地の動粘度は純水と同程度であり、代表速度と代表長さはそれぞれ、細胞の最大速度とマイクロ流路デバイスの高さとする。

計算すると、レイノルズ数は  $6.18 \times 10^{-5}$  となる。すなわち、マイクロ流路デバイス内の流れは層流である事が考えられる。今後は、マイクロ傾斜溝近傍の流れについて CFD などを用いて解析する必要がある。

マイクロ流路デバイスに細胞を導入する方法として、入口と出口の水頭差を使用する方法を用いた。先行研究では、シリンジポンプを使用し、流量一定の条件で実験を行っていた<sup>[11], [12]</sup>。しかし、マイクロ流路デバイスは流路抵抗が高く、設定している流量よりも実際の流量が小さくなることもある。そのため、シリンジポンプを用いると出口側に時間経過とともに引圧が上がっていき、速度が上昇してしまう問題があった。細胞がマイクロ傾斜溝の影響を受けるには、沈殿する時間が必要である。そのため、低速域の実験が必要であった。そこで、水頭差を利用することで、初期圧力が一定となり、速度は時間経過とともに減速していくため、本実験の目的に適切な方法であったと考えられる。

図 2-13 に示すように Hepa1-6, MC3T3-E1 とともに、細胞の直径と垂直移動量に相関は認められなかった。図 2-16 に示すように、細胞の直径が大きいほど、マイクロ傾斜溝から抜け出す際に必要な力が小さくなると考えられる。しかし、マイクロ傾斜溝のふちが細胞に及ぼす影響について考えると、サイズが大きいほど、鉛直上向きの力が高くなり、細胞がマイクロ傾斜溝から抜け出しやすくなると考えられる。本研究では、水頭差を用いた実験を行っており、継時的に細胞の速度が変化する実験となっている。細胞の速度は流体が細胞に及ぼす力と沈殿距離に影響するため、本実験においては細胞のサイズよりも大きな影響があったと考えられる。今後は、細胞の速度を一定にした実験を行い、細胞のサイズについても考慮する必要がある。

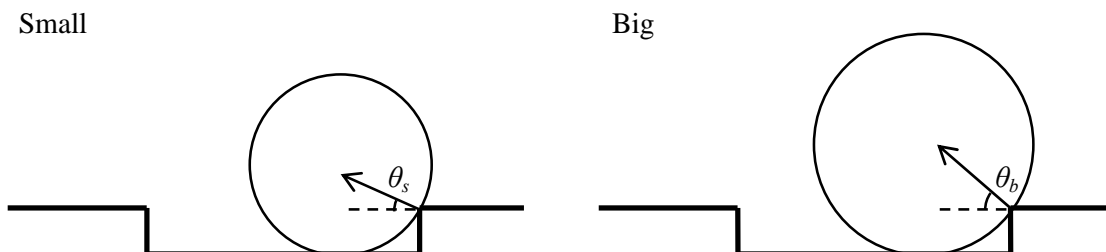


Fig. 2-16 傾斜溝が細胞に与える力。

図 2-15 に示すように MC3T3-E1 はマイクロ傾斜溝の幅が広がるほど、垂直移動量が増える傾向があった。マイクロ傾斜溝の幅が広がるにつれて、細胞が沈殿する時間が増える。つまり、より深く沈殿した細胞はマイクロ傾斜溝の影響を受けるようになる結果が得られた。一方で、Hepa1-6 は  $40 \mu\text{m}$  の垂直移動量が低下した。これは、Hepa1-6 の密度が小さいため、幅  $10 \mu\text{m}$  の差ではあまり影響がなかったと考えることができる。

また、MC3T3-E1, Hepa1-6 の垂直移動量を比較すると、 $40 \mu\text{m}$  と  $50 \mu\text{m}$  の幅において、Hepa1-6 は MC3T3-E1 と比べて垂直移動量が有意に大きいことが認められた。また、MC3T3-E1 と Hepa1-6 の速度の平均値はそれぞれ、 $190 \mu\text{m/s}$ ,  $380 \mu\text{m/s}$  であった。速度と垂直移動量には負の相関があるため、速度の速い Hepa1-6 は垂直移動量が小さくなると考えられるが、実際には逆の結果となった。先行研究では、様々な方法で細胞の密度を測定している<sup>[13], [14]</sup>。肝がん細胞の密度は  $1.05 \sim$

1.15 g/ml, 筋芽細胞の密度は 1.06 g/ml, 線維芽細胞の密度は 1.03～1.05 g/ml と報告されている<sup>[5]</sup>. このように, 由来組織によって細胞の密度が異なることが報告されているため, 本研究で得られた結果から肝がん細胞は骨芽細胞よりも密度が高いことを簡易的に示したと考えられる.

細胞は直径 20  $\mu\text{m}$  の球体であると仮定することができる. また, 流路内部のレイノルズ数は 2 以下であることから, 終末沈殿速度はストークスの式で表すことができる.

$$u = \frac{d^2(\rho_c - \rho_f)g}{18\mu}$$

ここで,  $u$  は終末沈殿速度,  $d$  は細胞の直径,  $\rho_c$  は細胞の密度,  $\rho_f$  は流体の密度,  $g$  は重力加速度,  $\mu$  は流体の粘性係数である. 本研究で使用している流体は水と同等の物理的性質であるため,  $\rho_f$  と  $\mu$  はそれぞれ, 997.8 kg/m<sup>3</sup>, 0.89 mPa s と仮定できる. 細胞の密度は先行研究から 1060 kg/m<sup>3</sup> とすると, 終末沈殿速度は 15.2  $\mu\text{m/s}$  となる. 他方, 作製したマイクロ傾斜溝の深さは 5  $\mu\text{m}$  であるため, 完全に沈殿するまでにかかる時間は 0.33 s である. つまり, 幅 50  $\mu\text{m}$  において, 細胞の速度が 152  $\mu\text{m/s}$  以下の時, 細胞は完全に沈殿することがわかる. また, がん細胞の密度は 1050～1150 kg/m<sup>3</sup> と幅が広い. 表 2-1 に細胞の密度が 1050 kg/m<sup>3</sup> から 1080 kg/m<sup>3</sup> のときの終末沈殿速度をまとめた. 表 2-1 を見るとわかるように, 細胞の密度が 10 kg/m<sup>3</sup> 変化すると, 終末沈殿速度が 2.5  $\mu\text{m/s}$  程度変化することがわかる. つまり, 図 2-15 に示した 300  $\mu\text{m/s}$  以下で Hepa1-6 と MC3T3-E1 の流れ方向垂直移動量に有意な差が認められたのは, 両細胞の密度が異なることが原因と推測できる.

Table 2-1 細胞の密度と終末沈殿速度

Cell density (kg/m <sup>3</sup> )	1050	1060	1070	1080
Terminal settling velocity ( $\mu\text{m/s}$ )	12.8	15.2	17.7	20.1

そこで, 細胞の密度を簡易的に測定するために, フタル酸ジブチル ( $\rho_b = 1050 \text{ kg/m}^3$ ) とフタル酸ジメチル ( $\rho_m = 1120 \text{ kg/m}^3$ ) を混合した, フタル酸エステルを作製した. フタル酸エステルの密度はフタル酸ジブチルとフタル酸ジメチルの混合比によって変更することが可能である. フタル酸エステルの密度は以下の式で算出することができる.

$$\rho_e = \frac{\rho_b V_b + \rho_m V_m}{V_b + V_m}$$

ここで,  $\rho_e$  はフタル酸エステルの密度,  $V_b$  はフタル酸ジブチルの体積,  $V_m$  はフタル酸ジメチルの体積である. また, マイクロピペットにも誤差があるため, フタル酸ジメチル, フタル酸ジブチルの重さを電子天秤によって測定しつつ密度の調整を行った. そして, 10 kg/m<sup>3</sup> ごとに 1050～1100 kg/m<sup>3</sup> のフタル酸エステルを作製した. このとき, それぞれのフタル酸エステルにおける密

度の誤差は1以下である。

続いて、培養ディッシュ上でサブコンフルエントまで増殖した後、細胞をトリプシン処理によって剥離し、細胞懸濁液を作製した。続いて、ヘマトクリット毛細管に細胞懸濁液とフタル酸エステルを毛細管現象によって吸引し、片側をパテで塞いだ。続いて、ヘマトクリット遠心機によって5分間、遠心分離を行い、ヘマトクリット毛細管に出てきたバンドによって細胞の密度を推定した。つまり、図2-17に示すように細胞の密度がフタル酸エステルより高いと、パテ側に細胞が沈殿し、逆に細胞の密度がフタル酸エステルよりも低いと、フタル酸エステルよりも上に細胞のバンドが現れる。

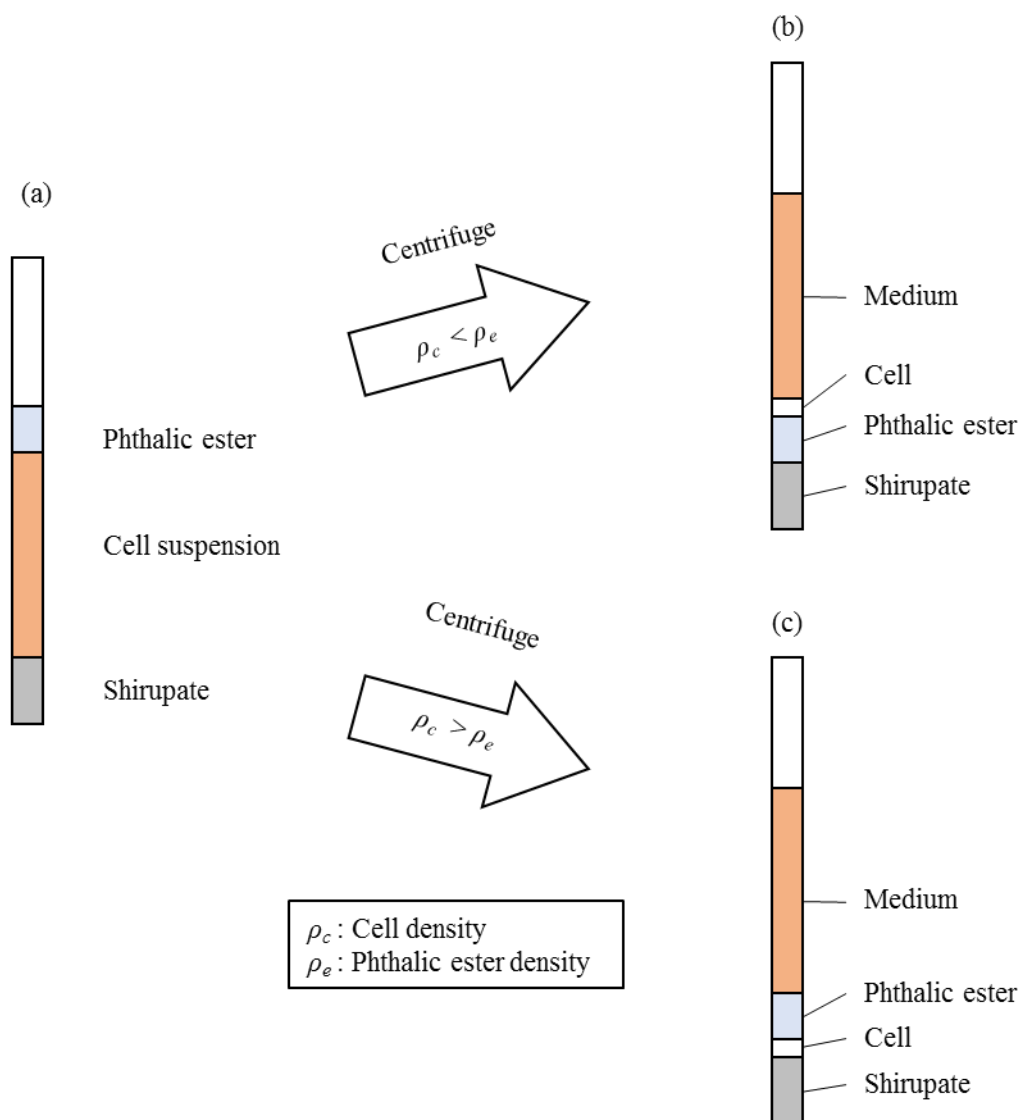


Fig. 2-17 フタル酸エステルによる細胞密度測定の詳細図。(a)：遠心分離前。(b)：細胞の密度がフタル酸エステルよりも小さい時の遠心分離後。(c)：細胞の密度がフタル酸エステルよりも大きい時の遠心分離後。

この方法によって Hepa1-6 と MC3T3-E1 の密度を測定したところ、Hepa1-6 の密度は 1070～1080



kg/m<sup>3</sup>であり、MC3T3-E1 の密度は 1060～1070 kg/m<sup>3</sup>であった。つまり、Hepa1-6 は MC3T3-E1 と比べて密度が高いと言える。これは図 2-15 に示した結果と合わせると、密度の高い細胞は密度の低い細胞よりもマイクロ溝の影響を大きく受けるということが出来る。しかし、この密度測定の実験は 1 度しか行っていないため、信憑性が低いため、繰り返し実験を行う必要がある。

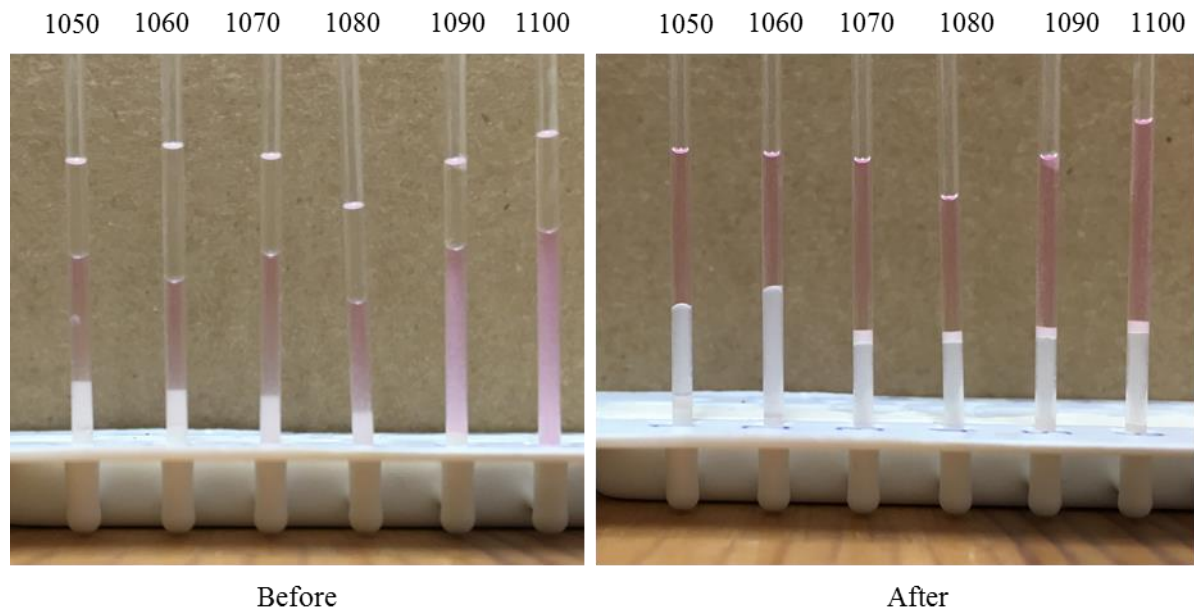


Fig. 2-18 MC3T3-E1 の密度分離の結果. 左：遠心分離前. 右：遠心分離後. 上部の数値はフタル酸エステルの密度 (kg/m<sup>3</sup>) である。

次に、算出した細胞の密度から沈殿距離を算出した。細胞の速度 300  $\mu\text{m/s}$ 、マイクロ傾斜溝の幅 40  $\mu\text{m}$  のとき、細胞の沈殿距離は Hepa1-6 が 2.36～2.68  $\mu\text{m}$ 、MC3T3-E1 の沈殿距離は 2.03～2.36  $\mu\text{m}$  である。つまり、マイクロ傾斜溝の深さ 5  $\mu\text{m}$  であることから、細胞は溝に沈みきっていないことがわかる。つまり、速度を下げることや溝の幅を広げることで、細胞がさらに沈殿するため、傾斜溝の影響を大きく受けると考えられる。今後の検討課題である。

また、本研究では、マイクロ傾斜溝の深さを 5  $\mu\text{m}$  と浅く設定した。この深さは細胞の直径よりも浅く、細胞が抜け出しやすくなっている。マイクロ傾斜溝の深さを深くすることで、細胞が傾斜溝に落ち、抜け出すことが困難となる可能性がある。つまり、本研究で用いた浅いマイクロ傾斜溝は細胞の密度差を検出することができ、かつ細胞を容易に回収することができる形状であると考えられる。

図 2-14 に示すように Hepa1-6、MC3T3-E1 とともに、細胞の速度と垂直移動量に負の相関が認められた。入口からマイクロ傾斜溝までの距離が 15 mm あり、助走区間が十分に得られていると考ええると、細胞の速度は流体の速度と同等であると考えられる。一方で、マイクロ流路デバイスは高さ 50  $\mu\text{m}$ 、幅 2 mm である。そのため、高さ方向に依存する平板間のポアズイユ流れが想定できる。つまり、壁面の速度が 0 であり、中心の速度が最大となる。一方で、流路の助走区間が十分

であると考え、細胞は底面を転がっていると考えることができる。細胞の直径は約  $15\text{ }\mu\text{m}$  であったため、細胞は流路の高さ方向において速度が異なる流れを受けている事が想定される。つまり、細胞はせん断力を受けている事が明らかであり、細胞が回転している事が想定できる。つまり、重力と浮力以外にもマグヌス効果が発生している可能性がある。マイクロ傾斜溝において細胞の正確な密度を測定する場合は考慮する必要がある。

細胞がマイクロ傾斜溝の影響を受け、主流に対して垂直に移動する理由として、傾斜溝から受ける力による影響が考えられる。鉛直方向から流路を見たとき、流路底面における細胞の断面を考える。図 2-19 に示すように、細胞とマイクロ傾斜溝が接触しており、細胞は流体から受ける力とマイクロ傾斜溝から受ける力を受けている。また、マイクロ傾斜溝から受ける力は主流方向の力と主流と垂直方向の力に分解することができる。この力によって、細胞は主流と垂直方向へ移動すると考えることができる。一方で、流体の流れもマイクロ傾斜溝によって影響を受けている可能性がある。今後は、CFD などを用いて流れの解析を行うことで、さらに詳細な検討を行うことが可能である。

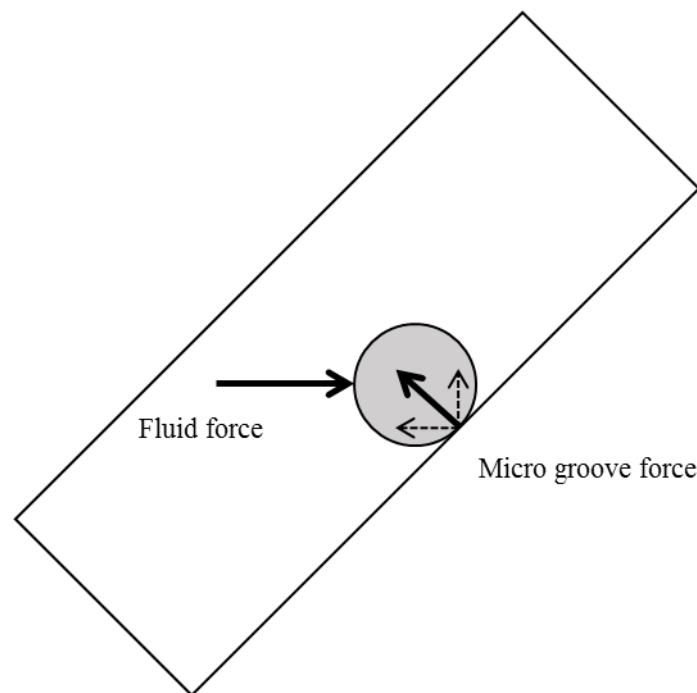


Fig. 2-19 マイクロ傾斜溝内の細胞にかかる力

2 章で作製したマイクロ流路デバイスを細胞分離システムへ応用するには、垂直移動量に有意な差が認められた、幅  $40\text{ }\mu\text{m}$  または  $50\text{ }\mu\text{m}$  の溝を複数配置する必要がある。マイクロ溝が 1 本ときには数  $\mu\text{m}$  の差であったが、本数が増えることで、差が大きくなることが予想される。このとき、細胞は図 2-20 の下側に導入する必要がある。そのため、入口を複数配置し、シーズ流を用いることで細胞の初期位置を一定にすることができる。また、分離した状態で細胞を回収するために、出口も複数配置する必要がある。これらの条件はさらに詳細に細胞の溝上の挙動を調べることで、決定することが可能であると考えられる。

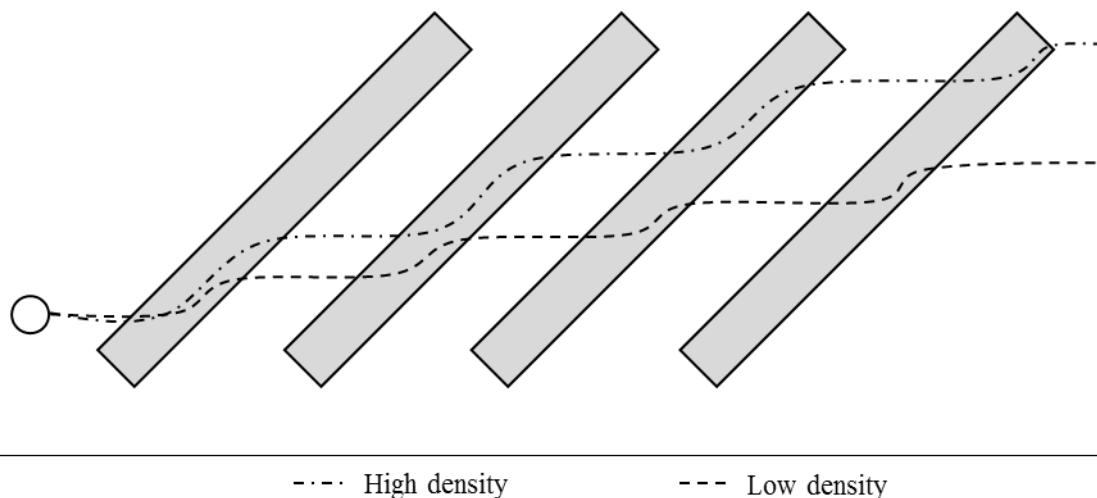


Fig. 2-20 マイクロ溝上における細胞の移動予測. 点線が低い密度の細胞, 一点破線が密度の高い細胞.

本研究では, 細胞の密度による傾斜溝パターンを用いて 2 種類の組織由来の細胞の挙動を観察した.  $40\ \mu\text{m}$ ,  $50\ \mu\text{m}$  の幅において, 2 種類の細胞に流れと垂直方向の移動量に有意な差が得ることができた. 今後, 細胞の挙動をさらに詳細に検討し, 導入, 回収位置の検討を行うことで, ラベルフリーの細胞分離技術への応用が期待される.

## 2-5. 結言

細胞種によって密度が異なるという仮説を立て,  $30\ \mu\text{m}$ ,  $40\ \mu\text{m}$ ,  $50\ \mu\text{m}$  の幅のマイクロ傾斜溝を有するマイクロ流路デバイスを作製した. MC3T3-E1 (マウス頭蓋骨由来骨芽細胞) と Hepa1-6 (マウス肝がん由来がん細胞) を用いて実験を行った. その結果, MC3T3-E1 では, マイクロ傾斜溝の幅が増加することにより, 細胞の垂直移動量が増加する傾向にあった. 一方で, Hepa1-6 は  $40\ \mu\text{m}$  の幅で垂直移動量が最低となる結果が得られた. また, 両細胞を比較すると,  $40\ \mu\text{m}$  と  $50\ \mu\text{m}$  幅において, Hepa1-6 は MC3T3-E1 と比べて垂直移動量が有意に大きい結果が得られた.

## 参考文献

- [1] Hashimoto, S., Takahashi, Y., Hino, H., Nomoto, R., Yasuda, T., Micro hole for trapping flowing cell, WMSCI 2014 - 18th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Proceedings, Vol. 2 (2014), pp. 114-119.
- [2] Hashimoto, S., Nomoto, R., Shimegi, S., Sato, F., Yasuda, T., Fujie, H., Micro trap for flowing cell, WMSCI 2013 - 17th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics, Proceedings, Vol. 1 (2013), pp. 1-6.
- [3] Grover, W.H., Bryan, A.K., Diez-Silva, M., Suresh, S., Higgins, J.M., Manalis, S.R., Measuring single-

cell density, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 108, No. 27 (2011), pp. 10992-10996.

- [4] Bryan, A.K., Hecht, V.C., Shen, W., Payer, K., Grover, W.H., Manalis, S.R., Measuring single cell mass, volume, and density with dual suspended microchannel resonators, Lab on a Chip, Vol. 14, No. 3 (2014), pp. 569-576.
- [5] Ron M., Rob P., Cell biology by the numbers 1 st Edition, (2015), p. 109.

### 3 章 円柱間スリットにおける細胞の変形・通過挙動

#### 3-1. 細胞種におけるマイクロスリット通過率測定

##### 3-1-1. 緒言

様々な組織由来の細胞の変形挙動を調べることは、新たな装置開発や病理診断などへ応用が期待される。2 章では細胞の密度の差によって沈殿速度が異なり、マイクロ傾斜溝の影響が異なると仮説を立てて実験を行った。マウス肝がん由来がん細胞 (Hepa1-6) とマウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) の 2 種類の細胞を用いて実験を行った。細胞の速度が  $300\text{ }\mu\text{m/s}$  以下の時、幅  $40\text{ }\mu\text{m}$ ,  $50\text{ }\mu\text{m}$  のマイクロ傾斜溝を通過するときの挙動に差があることを発見した。本章では細胞の変形能に着目した。本節では 4 種類の幅を持つマイクロスリットを作製し、3 種類の細胞の通過率について検討を行った。

##### 3-1-2. 方法

##### 3-1-2-1. 細胞懸濁液作製

初めに、細胞懸濁液を作製した。細胞はマウス横紋筋由来筋芽細胞 (C2C12)、マウス肝がん由来がん細胞 (Hepa1-6)、ブタ赤血球の 3 種類を使用した。C2C12 と Hepa1-6 は培養ディッシュ内で細胞を 70% から 90% まで増殖させ、トリプシン処理によって剥離させた。ブタ赤血球は株式会社芝浦臓器から購入したブタの全血を 1000 倍に希釈して使用した。また、ブタの全血は凝固を防ぐために、購入時にクエン酸ナトリウムが混合されて配送される。3 種類の細胞懸濁液をスライドガラス上に  $30\text{ }\mu\text{l}$  滴下し、カバーガラスでふたをすることで、プレパラードを作製した。図 3-1 にそれぞれの細胞を位相差顕微鏡で撮影した画像を示す。全ての細胞の 2 次元的な形状は円形であることがわかる。

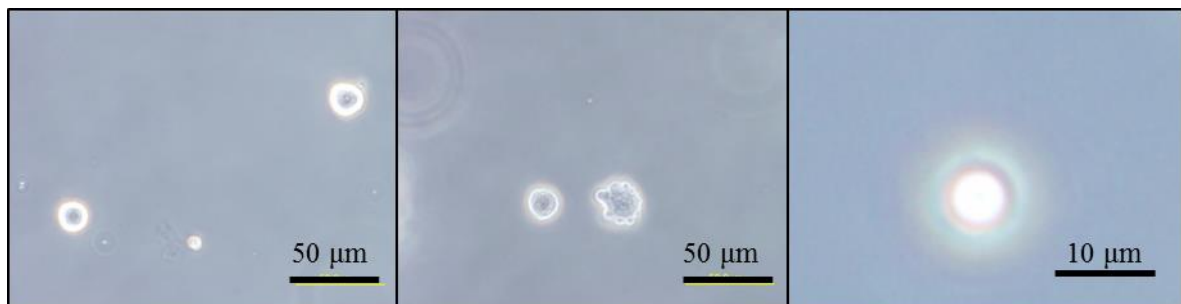


Fig. 3-1 細胞の位相差顕微鏡画像。左：C2C12，中：Hepa1-6，右：ブタ赤血球

##### 3-1-2-2. マイクロ流路デバイス

マイクロスリットはマイクロ円柱を複数配置し、円柱同士の間隙をスリットとして使用した。縦型マイクロスリットのメリットとして、1 つの流路内に複数の隙間のスリットを作製することが可能である。本研究では、図 3-2 に示すように、マイクロ円柱を 4 列に配置し、それぞれの列のスリットの幅を変更して実験を行った。マイクロスリットの寸法は C2C12 と Hepa1-6 の直径が

20  $\mu\text{m}$ であることを考慮し, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{m}$ とした.

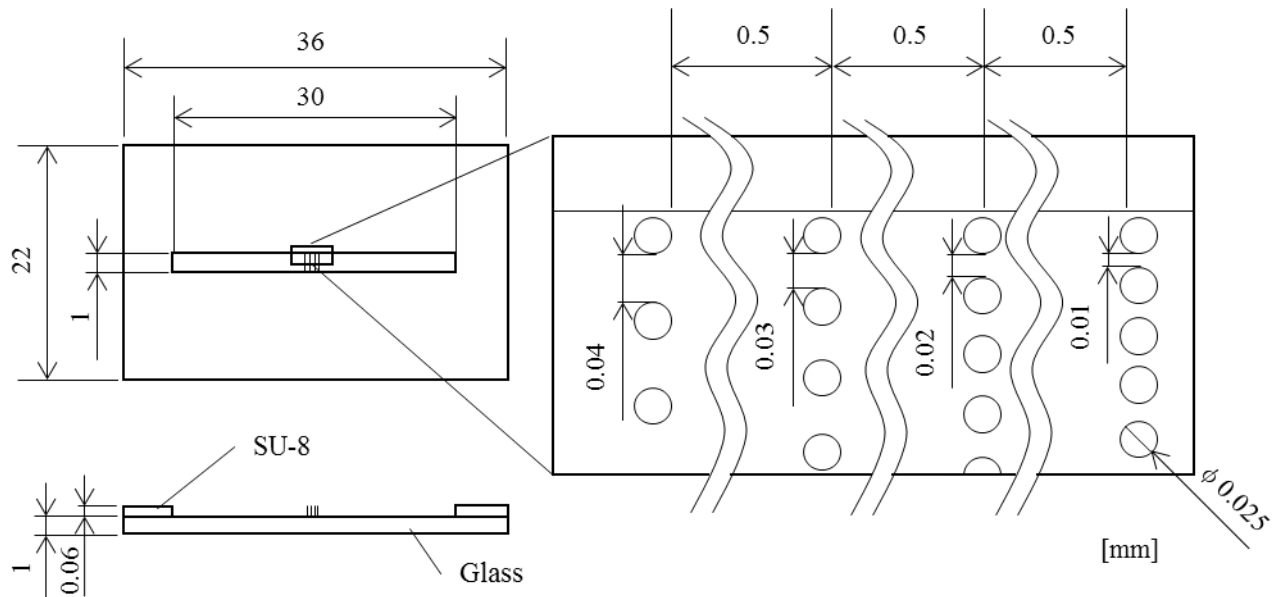


Fig. 3-2 下部基板の寸法. ガラス基板上に SU-8 でパターンを作製している.

マイクロ流路デバイスは平らな PDMS（上部基板）と円柱パターンと壁面を作製した下部基板を貼り合わせることで作製した. 初めに, 下部基板の作製方法を示す. 下部基板は 2 章の下部基板と同様の方法で作製した. すなわち, チタンを蒸着したガラス基板からフォトマスクを作製し, 作製したフォトマスクを用いて新たなガラス基板にパターンを作製した. 詳細な条件を下記に示す. 本章で使用するフォトマスクは 1 度の工程で作製するには時間がかかりすぎるため, 円のパターンを作製したフォトマスク A と流路部分を作製したフォトマスク B を組み合わせることで効率良く作製した (図 3-3).

初めに, フォトマスク A を作製した. 直径 50 mm のテンパックスガラスに  $\text{O}_2$  プラズマアッシング処理を施し, 表面に付着している埃や有機溶剤を除去した. 続いて, 電子ビーム蒸着装置によってチタンを 200 nm 蒸着した. 続いて, 再度  $\text{O}_2$  プラズマを照射した. 直後に HMDS を本速 3000 rpm で 30 秒間スピコートした後, ポジ型レジスト材 (OFPR-800) を本速 5000 rpm で 30 秒間スピコートした.  $95^\circ\text{C}$  のオーブンで 3 分間ソフトベークを行った. 続いて, レーザ直接描画装置によってパターン形状に露光した. PEB を  $65^\circ\text{C}$  のホットプレート上で 5 分間行った. そして, 現像液 (NMD-3) に 8 分間現像を行った. 純水で十分にリンスをした後, ドライエアを噴射させることで乾燥させた. 金属顕微鏡で現像度合いを確認した後, RIE を用いてドライエッチングを行った. 条件は  $\text{SF}_6$  と Ar の混合ガスを圧力 4 Pa 充填させた後, RF100W, で 5 分間処理を行った. エッチング後, 金属顕微鏡でエッチング度合いを確認し, 残存しているレジスト材をアセトンによって除去した.

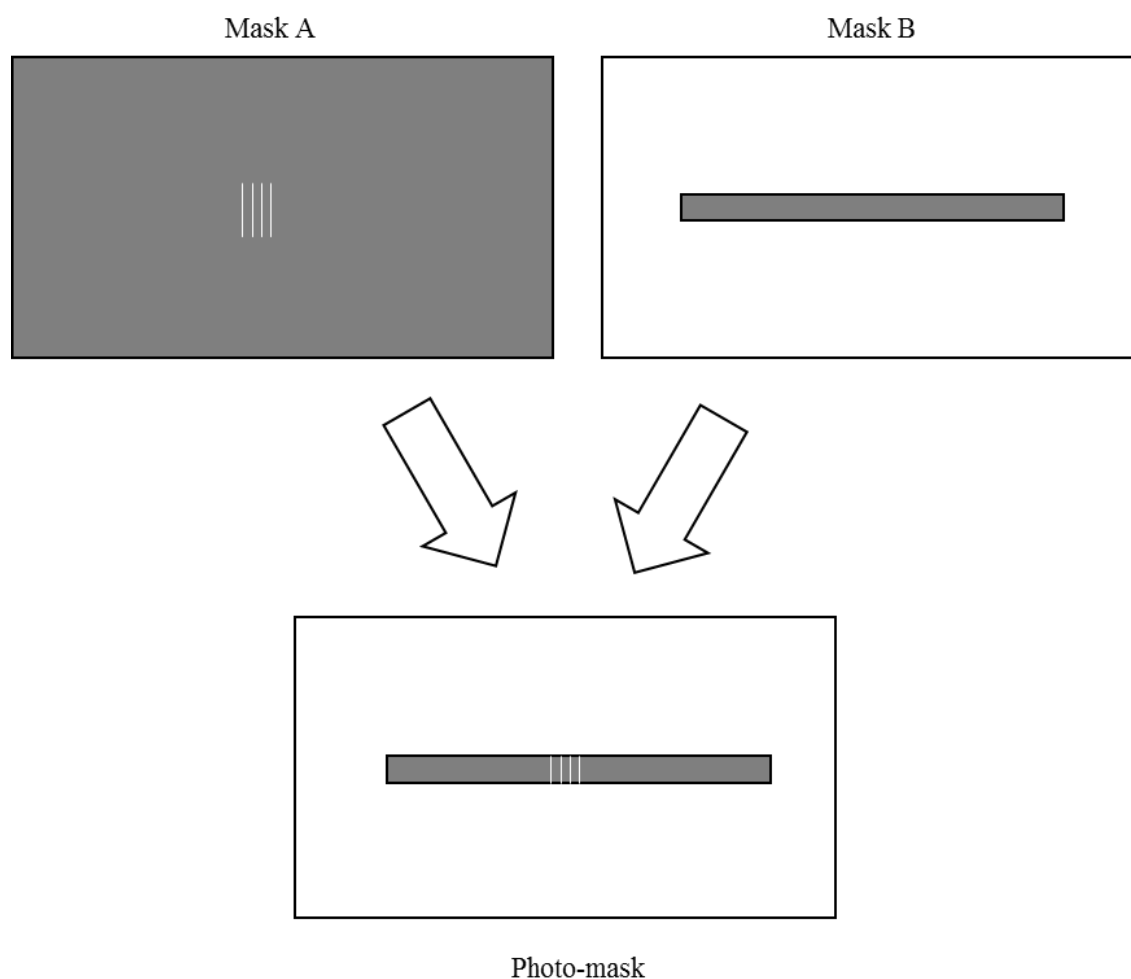


Fig. 3-3 フォトマスクの作製方法. Mask A と Mask B を作製し，2つのマスクを順に使用し，現像することで，フォトマスクが作製される．

続いて，フォトマスク B を作製した．フォトマスク A と同様の手順でソフトベークまで行った．続いて， $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 30\text{ mm}$  の角材をレジスト面に乗せ，マスクアライナによって紫外線を照射した．そして，PEB，現像，エッチングの順に作業を行うことで，フォトマスク B を作製した．

最後に，フォトマスクを作製した．他のフォトマスクと同様の手順でソフトベークまで行った．そして，フォトマスク B をレジスト材の上に置き，露光，現像を行った．OFPR-800 が現像されていることを確認し，再度フォトマスク A を用いて露光を行った．そして，現像後，ドライエッチングを行うことで，フォトマスクを作製した．

作製したフォトマスクを使用して，下部基板を作製した．初めに，半分にカットしたスライドガラスに  $\text{O}_2$  プラズマアッシング処理を施した．ただちに，ネガ型レジスト材（SU-8 10）を本速 1000 rpm でスピコートした． $65^\circ\text{C}$  のホットプレート上で 10 分間ソフトベークした．再度，SU-8 10 を本速 1000 rpm でスピコートした．ソフトベークをホットプレート上で 40 分間行った．続いて，作製したフォトマスクを使用して，パターンの露光を行った．ただちに，PEB を  $65^\circ\text{C}$  のオーブン内で 10 分間行った．そして，現像液（SU-8 Developer）に 10 分間浸漬することでパター



ンの現像を行った。現像後、IPA、純水の順にリンスを行い、120℃のホットプレート上で乾燥させた。作製した基板を走査型電子顕微鏡（SEM）によって観察した（図 3-4）。10  $\mu\text{m}$  の円柱間隙は上部で円柱同士が接着しているが、下部は平行に間隙が作製されていることが観察された。また、20  $\mu\text{m}$  の円柱間隙は接着することなく、きれいに作製されていることが確認できた。

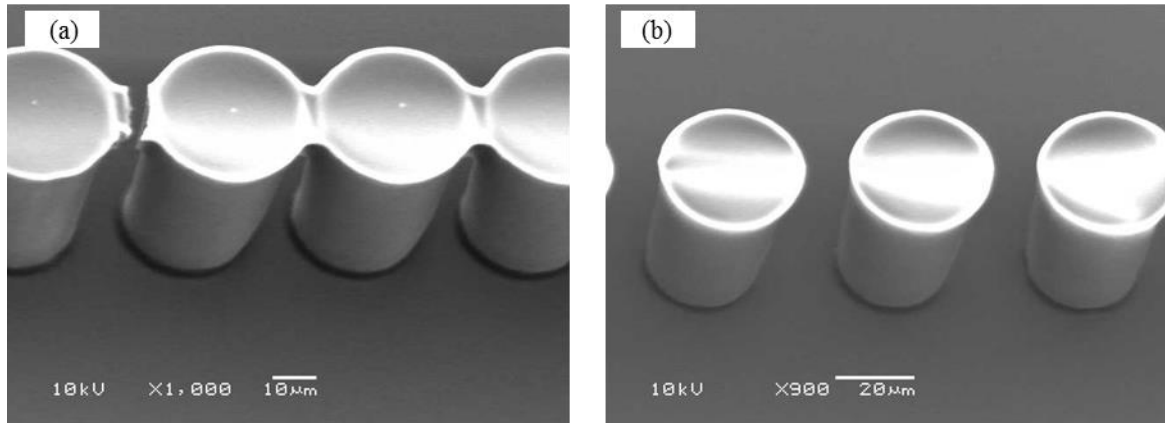


Fig. 3-4 マイクロスリットの SEM 画像. 左：10  $\mu\text{m}$ , 右：20  $\mu\text{m}$

続いて、上部基板を作製した。PDMS の主剤と硬化剤を体積比 10:1 で十分に混合した。続いて、真空デシケータ内で十分に脱気をした。スライドガラスにポリイミドテープを巻きつけ、その中に脱気した PDMS を 7ml 流し込んだ。そして、100℃のオーブン内で 1 時間焼結させた。焼結後、周りに存在するバリをカットし、PDMS を縦と横にそれぞれ半分にカットした。4 分の 1 の大きさの PDMS に直径 5 mm の穴を 2 つあけた。

PDMS は自己接着性に優れているため、作製した下部基板に上部基板を貼り合わせた。最後に、漏れが発生しないように、貼り合わせた PDMS の周りに硬化前の PDMS を塗り、100℃のオーブンで 1 時間焼結した。

### 3-1-2-3. 流路システム

流路システムの概要を図 3-5 に示す。流路システムは位相差顕微鏡、流路デバイス、デジタルカメラの 3 要素で構成される。位相差顕微鏡に流路デバイスを設置し、接眼レンズ越しにデジタルカメラを設置することで、動画の撮影を行った。デジタルカメラの使用はフレームレートが 30 fps, シャッタースピードが 1000  $\text{s}^{-1}$  である。細胞は入口と出口の水頭差を利用して流路内に流入させた。流路デバイスに使用している PDMS は疎水性材料であるため、未処理では液体を流入させることはできない。そこで、 $\text{O}_2$  プラズマ処理を施し（50 W, 1 分）流路デバイスに親水化処理を施した。親水化処理直後に 60  $\mu\text{l}$  の生理食塩水を注入した。続いて、流路デバイスを位相差顕微鏡上にセットした。そして、低圧力状態における細胞の変形挙動を観察するために、マイクロピペットを用いて流路内に細胞懸濁液を 30  $\mu\text{l}$  注入した。水頭差は時間ごとに変化するが、細胞懸濁液の追加は行わずに実験を行った。それぞれの細胞において、新品の流路デバイスを 5 つずつ使用して実験を行った。

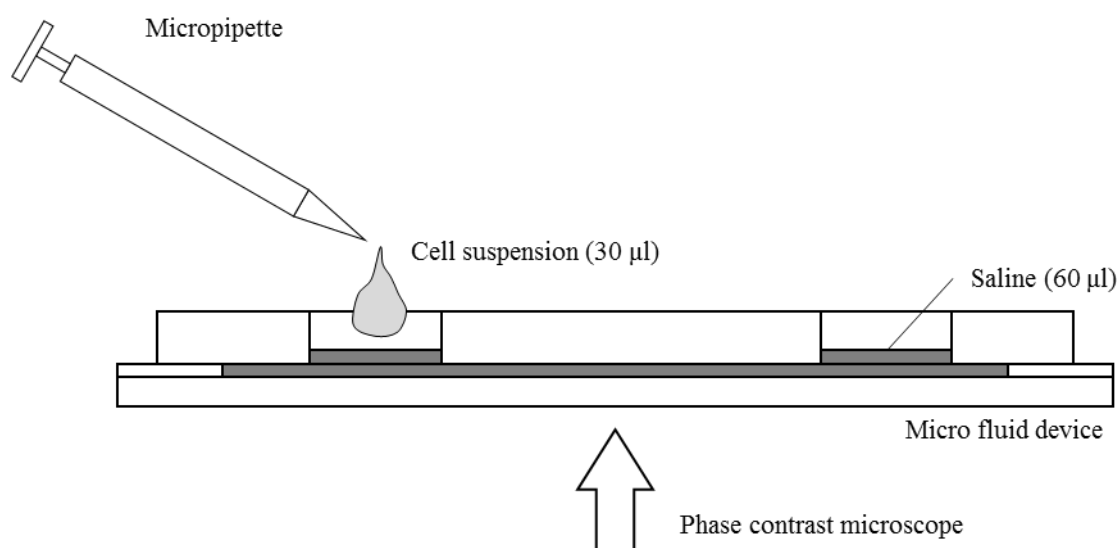


Fig. 3-5 流路実験方法. マイクロ流路内を生理食塩水で満たしておき、マイクロピペットを用いて細胞懸濁液を 30  $\mu\text{l}$  注入する. マイクロスリット部分の挙動は位相差顕微鏡によって観察した.

#### 3-1-2-4. 評価方法

本研究では、3 種類の細胞の変形能について検討を行うために、細胞のスリットの通過率について検討を行った. 初めに、細胞の大きさの測定を行った. 作製した細胞懸濁液をスライドガラス上に 1 滴滴下し、カバーガラスで挟み込むことで、プレパラードを作製した. 倒立型位相差顕微鏡を用いて、細胞の画像を撮影し、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて測定を行った. 1 種類の細胞につき、20 個測定した.

続いて、細胞のスリット通過率を計測した. 撮影した動画から細胞の数を測定することで、細胞のスリット通過率を測定した. 細胞の通過率は以下の式で表すことができる.

$$R_{tr} = \frac{N_{tr}}{N} \times 100$$

ここで、 $R_{tr}$  は細胞の捕捉率、 $N_{tr}$  はスリットに捕捉された細胞数、 $N$  は細胞の総数である. それぞれの細胞において、新しいマイクロ流路デバイスを用いて 5 回行った. 本研究では、2 種類の細胞の比較を行うために、統計処理を行った. 正規分布の 2 群間の差を求めるために、Student t 検定を用いた. また、有意水準は  $P < 0.05$  とした.

#### 3-1-3. 結果

初めに、細胞の大きさの測定を行った結果を図 3-6 に示す. C2C12 の平均直径は 23.0  $\mu\text{m}$  であり、一方で、Hep1-6 の平均直径は 23.3  $\mu\text{m}$  であった. 両細胞間に有意な差は認められなかった. 一方で、ブタ赤血球は平均直径が 5.2  $\mu\text{m}$  であり、C2C12 と Hep1-6 よりも小さい細胞であった.

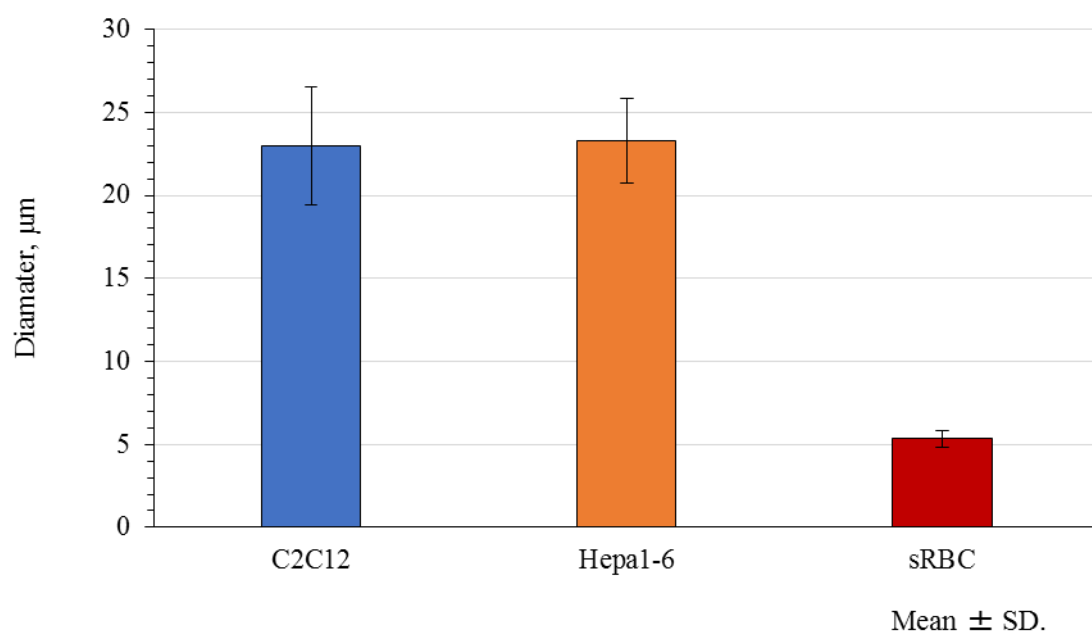


Fig. 3-6 細胞直径の測定結果.

続いて、図 3-7 に細胞の時間と細胞の速度の関係を示す。時間経過とともに、細胞の速度が下がっており、また、時間が進むにつれて速度変化の割合が小さくなった。

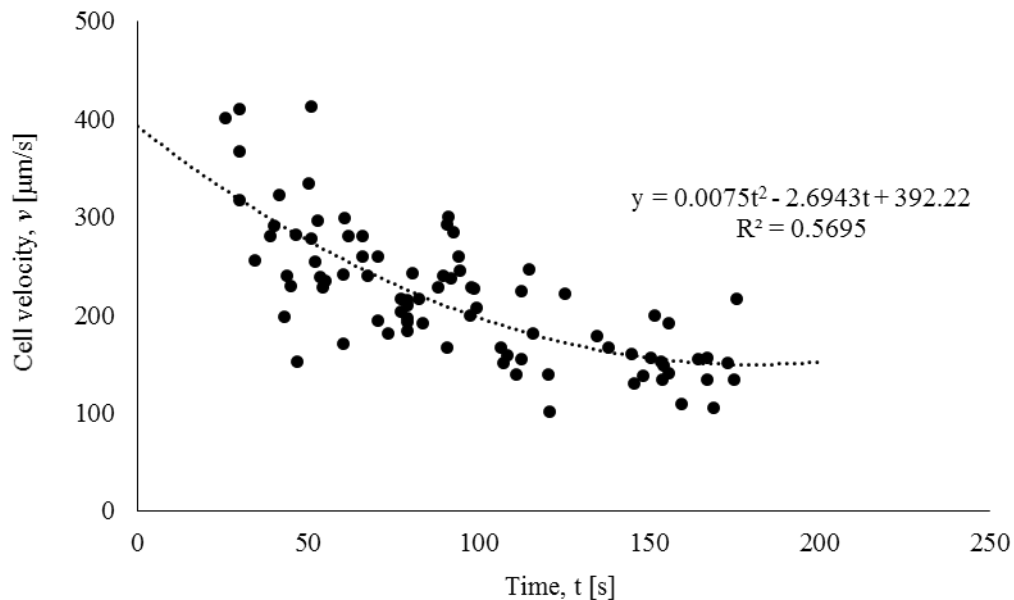


Fig. 3-7 各時間における細胞速度.

続いて、図 3-8 に細胞のスリット捕捉率の結果を示す。ブタ赤血球はすべてのスリットにおいて、ほぼ 100%通過する様子が確認できた。C2C12 は 10, 20, 30  $\mu\text{m}$  スリットにおいて、捕捉率はそれぞれ、100%, 80%, 30%となった。同様に Hepa1-6 の捕捉率は 100%, 45%, 10%となった。

C2C12 と Hepa1-6 の捕捉率を比較すると、20, 30  $\mu\text{m}$  スリットにおいて、C2C12 の捕捉率が有意に高い結果となった。

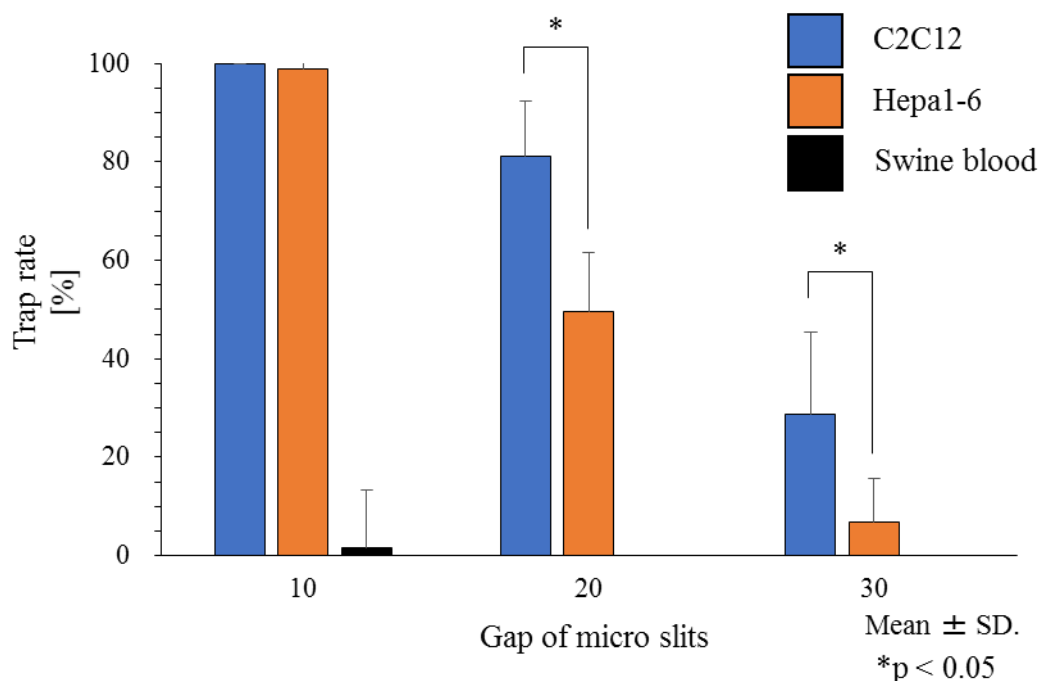


Fig. 3-8 各スリットにおける細胞の捕捉率.

#### 3-1-4. 考察

細胞の種類によって硬さが異なるという仮説を立て、10, 20, 30, 40  $\mu\text{m}$  の幅を有するマイクロスリットを作製した。水頭差を用いた実験を行い、圧力を 15 Pa 以下とし、3 種類の細胞（筋芽細胞、肝がん細胞、ブタ赤血球）で実験を行った。20 と 30  $\mu\text{m}$  のスリットにおいて、C2C12 と Hepa1-6 のスリット通過率が異なることを見出した。

本研究では、入口側に細胞懸濁液を注入することで水頭差を作製した。注入する速度によって水頭差が変わる可能性がある。使用した細胞懸濁液の体積はマイクロピペットによって制御されており、30  $\mu\text{l}$  であるため、1 滴以下の水滴を滴下するため、注入速度には変化がないとした。また、途中で細胞懸濁液の追加を行っていないため、時々刻々と水頭差が変化していた。高圧力になるほど、細胞の通過率が上がると考えることができる。そのため、本実験では初期圧力を 15 Pa と設定し、15 Pa 以下において細胞の通過率を測定する実験とした。

先行研究ではシリンジポンプを用いて流量一定で実験を行っている。しかし、マイクロ流路デバイスの抵抗が高く、実際の流量はシリンジポンプの設定流量以下になってしまう問題があった。つまり、継時的に内部圧力が上昇してしまい、かつ、内部圧力がわからないという問題があった。水頭差を用いる実験では初期圧力が決定できるため、この問題を解決することができたと考えられる。今後、高圧力環境かつ圧力一定の条件で実験を行う際にはシリンジポンプにフィードバック回路を作製し、圧力によってどのように細胞の変形に影響を与えるかを調査する必要がある。

流れの状態を調べるための数値として、レイノルズ数がある。レイノルズ数は以下の式で表される。

$$Re = \frac{UL}{\nu}$$

ここで、 $Re$  はレイノルズ数、 $U$  は代表長さ、 $L$  は代表速度、 $\nu$  は流体の動粘度である。代表長さを流路の高さとし、代表速度を細胞の最大速度とし、動粘度は水と同等であるとする、レイノルズ数は 0.002 となる。つまり、流路内部に円柱が存在しても流れの剥離は起こらず、定常流であると考えられる。

図 3-6 に示した細胞の直径は撮影した画像から手動で細胞の輪郭を囲い、面積から直径を算出した。先行研究では、機械的に細胞の大きさを測定しており、ブタ赤血球は直径  $7\mu\text{m}$  と報告している。本研究で測定した結果は  $6\mu\text{m}$  であり、ほぼ互角であると考えられるため、この測定方法に問題はないと考えられる。しかし、多くの細胞の直径を測定するためには手動では不可能であるため、将来的には自動化する必要がある。

作製したマイクロ流路デバイスを用いて 3 種類の細胞の通過率を測定した。図 3-8 に示すように、細胞の直径がスリットよりも小さいブタ赤血球は  $10\mu\text{m}$  のスリットも 100% 通過する様子が観察できた。一方で、C2C12 のスリット捕捉率は 10, 20, 30,  $40\mu\text{m}$  においてそれぞれ、100%, 80%, 30%, 0% であった。また、Hepa1-6 のスリット捕捉率は 10, 20, 30,  $40\mu\text{m}$  においてそれぞれ、100%, 45%, 10%, 0% であった。両細胞とも  $10\mu\text{m}$  のスリットにおいて、100% の細胞が捕捉される結果となった。20 と  $30\mu\text{m}$  のスリットでは Hepa1-6 のスリット通過率が高い傾向にあった。この 2 種類の細胞の直径はおよそ  $20\mu\text{m}$  と同等であることから、Hepa1-6 の弾性率が低いと考えることができる。この細胞の弾性率の差を数値的に解析することができれば、細胞分離システムへの応用が期待される。

3-1 で作製した円柱マイクロスリットを細胞分離システムへ応用するためには、いくつか検討する必要がある。まず、マイクロ流路システムにシリンジポンプを接続し、圧力を測定しフィードバックするシステムが必要である。マイクロ流路内の圧力と細胞の弾性率から細胞がスリットを通過できるしきい値が算出することが可能である。続いて、捕捉した細胞を回収する機構を追加する必要がある。図 3-9 に示すように、各間隔のスリットの間の壁面に別の流入出口を作製することで、細胞を分離した後に、回収することができると考えられる。初めに、メイン流路から細胞懸濁液を導入し、細胞を円柱スリットに細胞を捕捉させる。続いて、メイン流路を止め、サブ流路から流れを作製する。すると、捕捉されていた細胞が壁面方向に移動し、回収することができると考えられる。今後、このような細胞分離システムについて検討する必要がある。

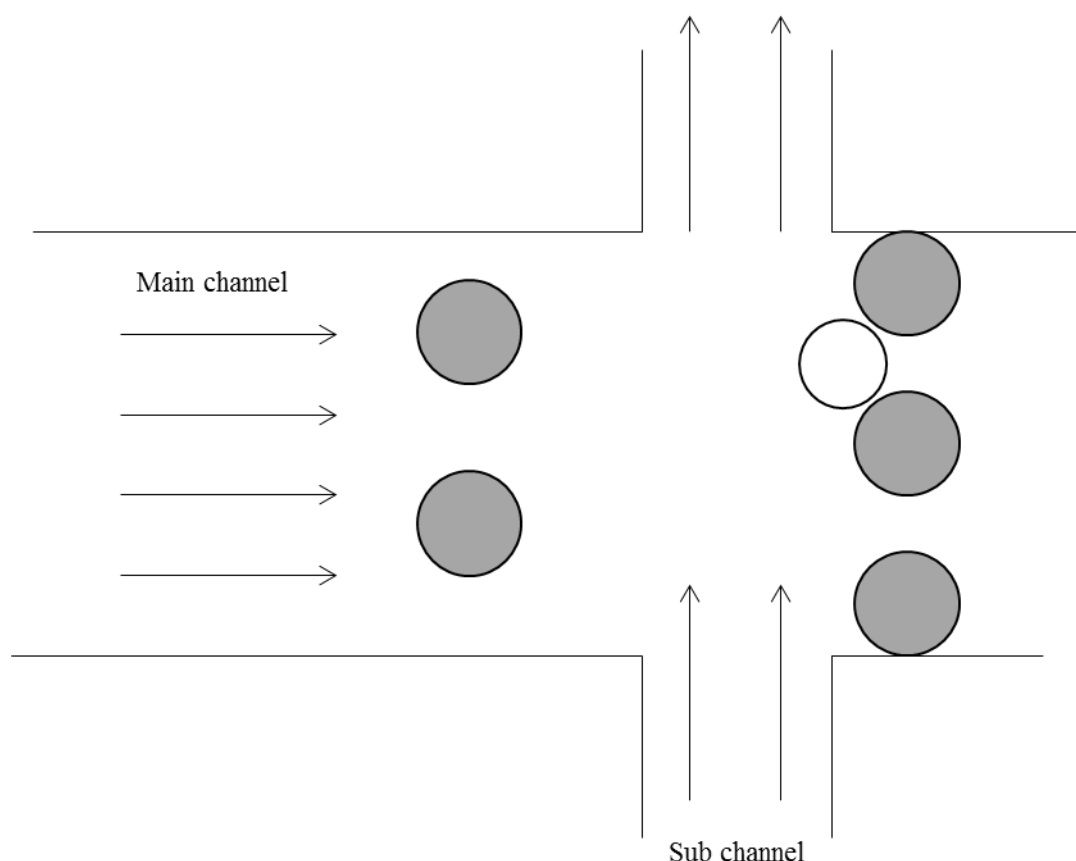


Fig. 3-9 細胞回収システムの概要. メイン流路から細胞を流入し, 細胞分離後, サブ流路に切り替えて細胞を回収する.

細胞よりも幅の広いスリットに捕捉される様子も確認された. これらの細胞を観察すると, マイクロ円柱に接着している細胞や, 複数の細胞がコロニーとなって流れてきた細胞が捕捉されていた. そのため, 入口側に幅の広いスリットを用意することで, フィルタ機能を満たしていると考えられる. また, マイクロ円柱に細胞が接着する様子が確認された. C2C12 と Hepa1-6 は接着性の細胞であることから, マイクロ円柱に接着したと考えられる. 先行研究では, 細胞の接着を利用した細胞捕捉デバイスが検討されている<sup>4)</sup>. このように, 細胞の基板接着力とスリットの捕捉を組み合わせることで, 回収効率や分離能を向上させることができる可能性がある. 今後, 詳細な検討を行うために, 細胞の接着を阻害する必要がある.

### 3-1-5. 結言

細胞の硬さに着目し, マイクロ円柱を複数配置し, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{m}$  の幅を有するマイクロスリットを作製した. 水頭差を利用した実験系を構築し, 入口と出口の水頭差を 30 Pa 以下とし, 実験を行った. その結果, 10  $\mu\text{m}$  スリットでは C2C12 (マウス横紋筋由来筋芽細胞) と Hepa1-6 (マウス肝がん由来がん細胞) は全て捕捉される結果となった. また, 20 と 30  $\mu\text{m}$  のスリットでは C2C12 は Hepa1-6 と比べてスリット捕捉率が有意に高い傾向が認められた.

## 3-2. 縦型マイクロスリットによる血中循環がん細胞捕捉の基礎検討

### 3-2-1. 背景

3-1 では、細胞の変形性に着目して、4 種類の幅のスリットを有するマイクロ流路デバイスを作製した。その結果、細胞の種類によって通過率が異なることを見出した。つまり、細胞の弾性率に違いがあることが考えられる。本節では、作製したマイクロ流路デバイスの医学応用を目指し、CTC を血液中から分離する実験を行った。さらに、がん細胞の変形挙動を詳細に調べることを行った。

### 3-2-2. 方法

#### 3-2-2-1. 細胞懸濁液作製

本研究では、ブタ血液と肝がん由来がん細胞（Hepa1-6）の 2 種類の細胞を使用した。血液は赤血球や白血球、血小板などの成分で構成されており、中でも赤血球は血液の 20% を占める割合で存在している。また、ブタ赤血球はヒト赤血球と同等の大きさ（直径 6-7  $\mu\text{m}$ ）であることが知られている<sup>[1]</sup>。一方で、肝臓がんは日本人のガンの中で 5 番目に多く、がん患者全体の 8% を占める<sup>[2]</sup>。

ブタ血液はそのまま使用すると、赤血球濃度が濃く光を透過することができない。つまり、がん細胞と同時に流した際にがん細胞の挙動の観察をすることができなくなってしまう。そこで、生理食塩水と希釈して実験に使用した。赤血球の調整方法は 3-1-2-1 と同様の方法で行った。すなわち、0.9% の生理食塩水を作製し、沈殿しているブタ赤血球と生理食塩水を 1:100 で希釈した。希釈したブタ血液のヘマトクリット値は株式会社久保田製作所のヘマトクリットリーダーを用いて測定を行った。

続いて、Hepa1-6 の懸濁液を作製した。懸濁液の作製方法は 3-1-2-1 と同様の手順で行った。すなわち、培養ディッシュ内で細胞がサブコンフルエント状態まで増殖したところで、トリプシン処理によって細胞を剥離した。そして、セルカウントを行い、細胞懸濁液の濃度を 5000 cells/cm<sup>2</sup> となるように希釈した。希釈には D-MEM と上記で作製したブタ赤血球試料の 2 種類で行った。

#### 3-2-2-2. マイクロ流路デバイス

3-1 では、マイクロスリットの幅を 10 から 40  $\mu\text{m}$  とし、10  $\mu\text{m}$  おきに作製した。しかし、細胞の大きさは赤血球が約 7  $\mu\text{m}$  であり、Hepa1-6 の直径が約 20  $\mu\text{m}$  である。つまり、肝心な細胞が変形する様子を観察することができていなかった。そこで、本実験では、ブタ赤血球が通過することが可能、かつ、Hepa1-6 が捕捉される幅として、マイクロスリットの幅を 10 から 25  $\mu\text{m}$  とし、5  $\mu\text{m}$  おきに作製した（図 3-10）。

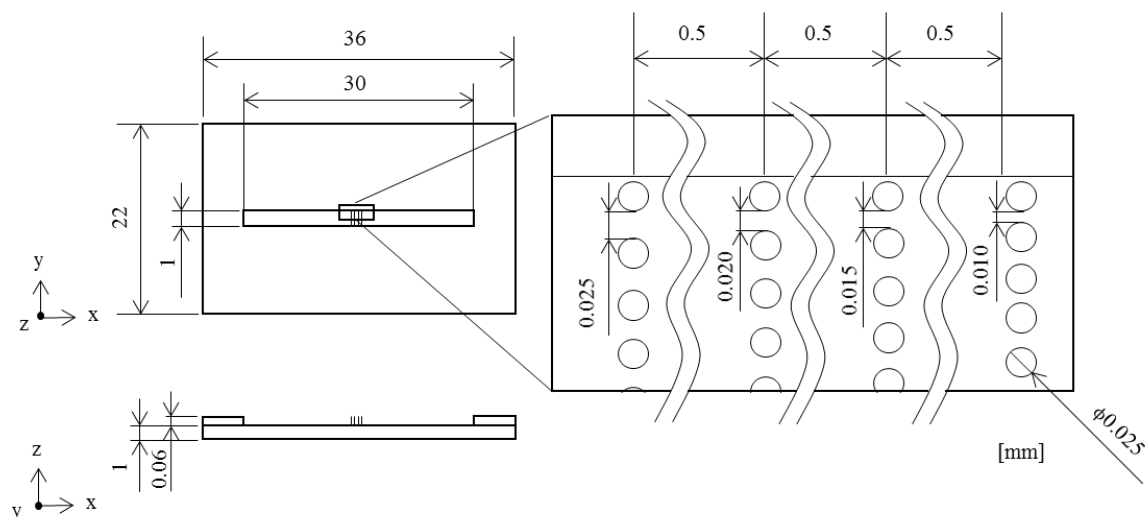


Fig. 3-10 マイクロ流路デバイスの寸法

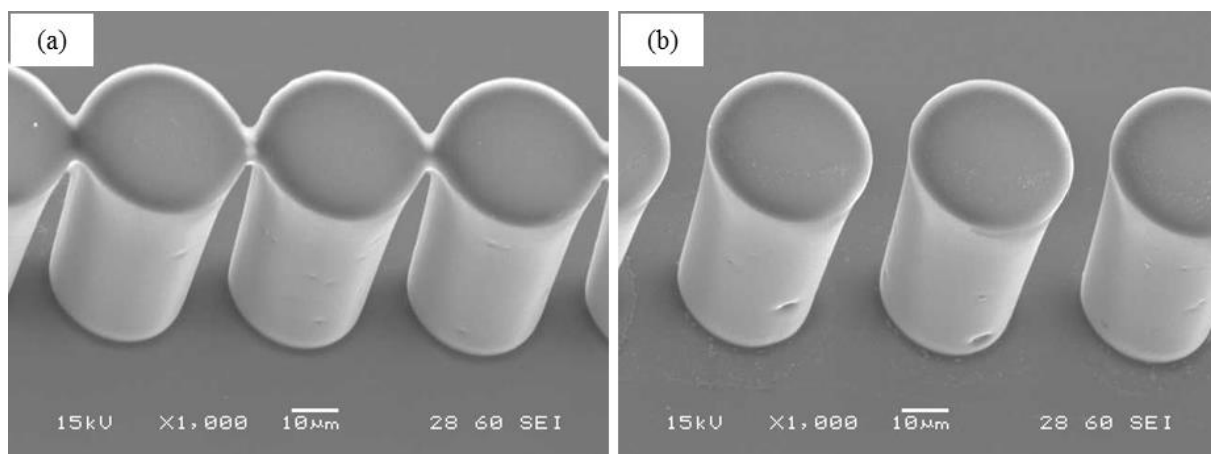


Fig. 3-11 マイクロ円柱のSEM画像. (a): 10  $\mu\text{m}$  幅, (b): 15  $\mu\text{m}$  幅

マイクロデバイスの作製方法は 3-1 と同様であるため、簡易的に示す．初めに、スライドガラスにチタンを蒸着し、ポジ型レジスト材を用いたフォトリソグラフィにてフォトマスクを作製する．続いて、新たなスライドガラス基板にネガ型レジスト材を用いて円柱と流路形状を作製する．そして、フラットな PDMS に穴を 2 つ開け、作製した基板と接着することで、マイクロ流路デバイスを作製した．作製したマイクロパターンは走査型電子顕微鏡によって観察を行った (図 3-11)．3-1 と比べ、10  $\mu\text{m}$  の円柱間隙では、上部が接合してしまっている．また、15  $\mu\text{m}$  の円柱間隙では、円柱同士の接合は見られなかった．

### 3-2-2-3. 流路実験

本研究では、細胞の速度と捕捉率の関係を見るために、入口・出口の水頭差を用いる方法を採用した．マイクロ流路デバイスに使用している PDMS は疎水性材料であるため、そのまま実験に使用することはできない．そこで、実験前に  $\text{O}_2$  プラズマ処理 (100W, 1 分) を施した． $\text{O}_2$  プラズ



マ後、時間とともに疎水性に戻っていくため、O<sub>2</sub>プラズマ処理直後に生理食塩水を流路内に満たした。初期水頭差を 0 にするため、生理食塩水で満たした後、30 分間静置した。そして、スリット幅 25 μm 側からマイクロピペットを用いて、細胞懸濁液を 30 μl 導入した。細胞の観察は位相差顕微鏡の接眼レンズ越しにデジタルカメラを設置し、動画の撮影を行った。

#### 3-2-2-4. 評価方法

初めに、ブタ赤血球と Hepa1-6 の直径を計測した。作製した細胞懸濁液をスライドガラス上に滴下し、カバーガラスを被せることで、プレパラードを作製した。細胞の画像を位相差顕微鏡で撮影し、画像解析ソフトウェア ImageJ を用いて細胞の面積を算出した。Hepa1-6 はほぼ球体であり、ブタ赤血球はバイコンチューブ型である。両細胞とも位相差顕微鏡の画像では円形の形状となる。そこで、細胞の面積から直径を算出した。

続いて、時間変化における細胞の速度変化について測定を行った。撮影した動画から動作解析ソフトウェア kinovea を用いてフレームごとの細胞の移動距離の測定を行った。本研究で使用しているデジタルカメラはフレームレートが 30 fps であるため、移動距離を時間で除することで速度を算出することができる。

次に、細胞の挙動について評価を行った。本研究では、細胞の挙動は 3 つに分類できる。スリットに捕捉される細胞、スリットを通過する細胞、スリットに関係なく基板に接着する細胞とした。初めに、各スリット幅における細胞の捕捉率を測定した (図 3-12)。

$$Tr_1 = \frac{N_{tr}}{N_{tr} + N_{th}}$$

ここで、 $Tr_1$  は細胞の捕捉率、 $N_{tr}$  はスリットに捕捉された細胞数、 $N_{th}$  はスリットを通過した細胞数である。続いて、基板への接着を含めてスリット幅 15 μm と 20 μm で評価を行った。細胞の速度は kinovea を用いて数フレーム間の平均速度を算出した。そして、各細胞の速度ごとにスリット間に捕捉された細胞数とスリット間を通過した細胞数、基板に接着した細胞数を計測し、それぞれの割合を算出した。

$$Tr_2 = \frac{N_{tr}}{N_{tr} + N_{th} + N_{ad}}, \quad Th = \frac{N_{th}}{N_{tr} + N_{th} + N_{ad}}, \quad Ad = \frac{N_{ad}}{N_{tr} + N_{th} + N_{ad}}$$

ここで、 $Tr_2$  は細胞の捕捉率、 $Th$  は細胞の通過率、 $Ad$  は細胞の基板接着率、 $N_{tr}$  はスリットに捕捉された細胞数、 $N_{th}$  はスリットを通過した細胞数、 $N_{ad}$  は基板に接着した細胞数である。ここでは、全実験における細胞数を合計して、算出した。

続いて、それぞれのスリットに捕捉された細胞の直径を測定した。流路実験後、位相差顕微鏡を接続している PC でそれぞれのスリットの画像を撮影した。撮影した画像から、ImageJ によって捕捉されている細胞の面積を測定し、直径を算出した。それぞれのスリット幅によって比較を

行うために、Student t 検定を行い、有意水準  $P = 0.05$  を用いて有意差の判定を行った。

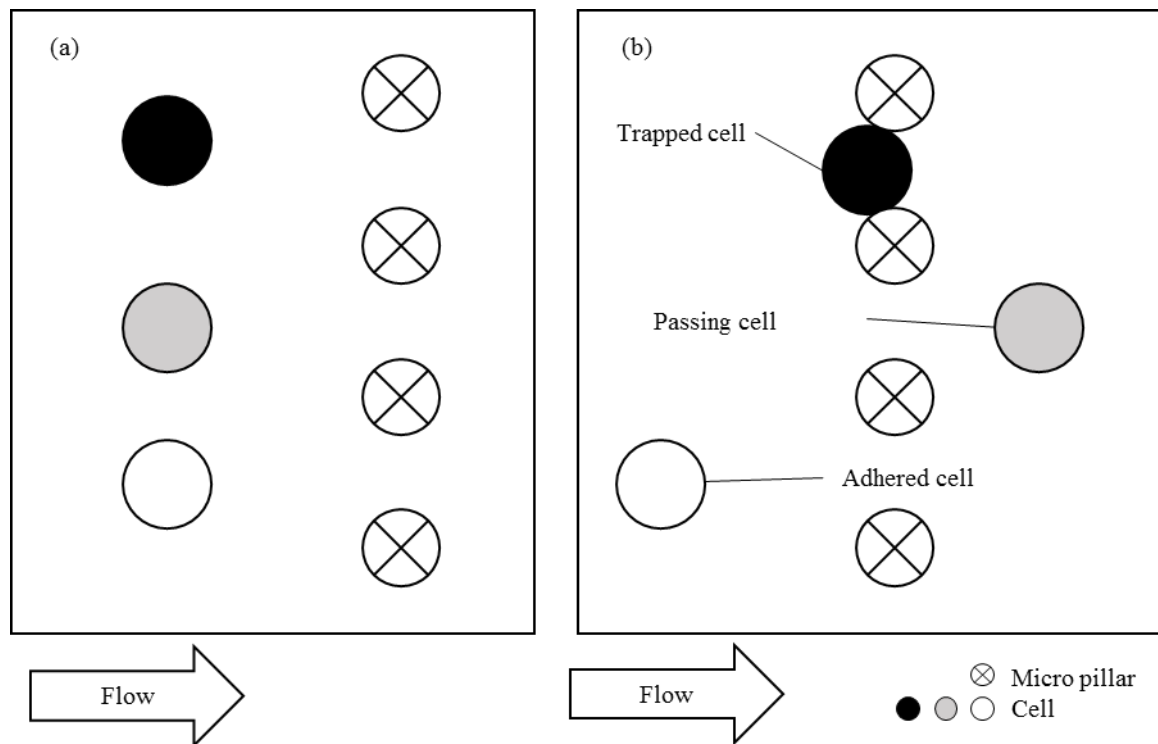


Fig. 3-12 評価方法の簡易図. 黒丸：捕捉された細胞，灰丸：通過した細胞，白丸：基板に接着した細胞

最後に、ブタ赤血球と Hepa1-6 を混合した懸濁液を用いて実験を行った。スリット幅  $10\mu\text{m}$  に着目し、Hepa1-6 とブタ赤血球の挙動について観察を行った。

### 3-2-3. 結果

初めに、ブタ血液を用いて実験を行った。撮影した動画から細胞を追跡することで、円柱間隙幅  $10\mu\text{m}$  を通過する様子が観察された (図 3-13)。このことから、ブタ赤血球は円柱間隙幅  $10\mu\text{m}$  を問題なく通過していると考えられる。

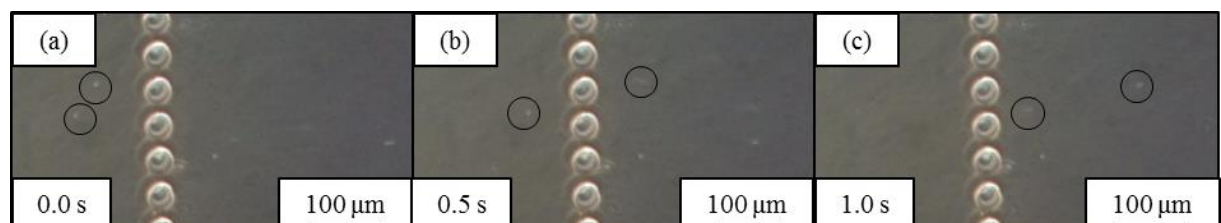


Fig. 3-13 ブタ血液の実験結果. (黒丸) ブタ赤血球. (a) 0 秒後. (b) 0.5 秒後. (c) 1 秒後

続いて、Hepa1-6 を用いて実験を行った。初めに、各円柱間隙幅における細胞の捕捉率を算出

した (図 3-14). 円柱間隙幅が 10  $\mu\text{m}$  では Hepa1-6 の捕捉率がほぼ 100%であり, 15  $\mu\text{m}$  では約 80%となった. 円柱間隙幅が 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$  では細胞の捕捉率は 37%, 26%であった.

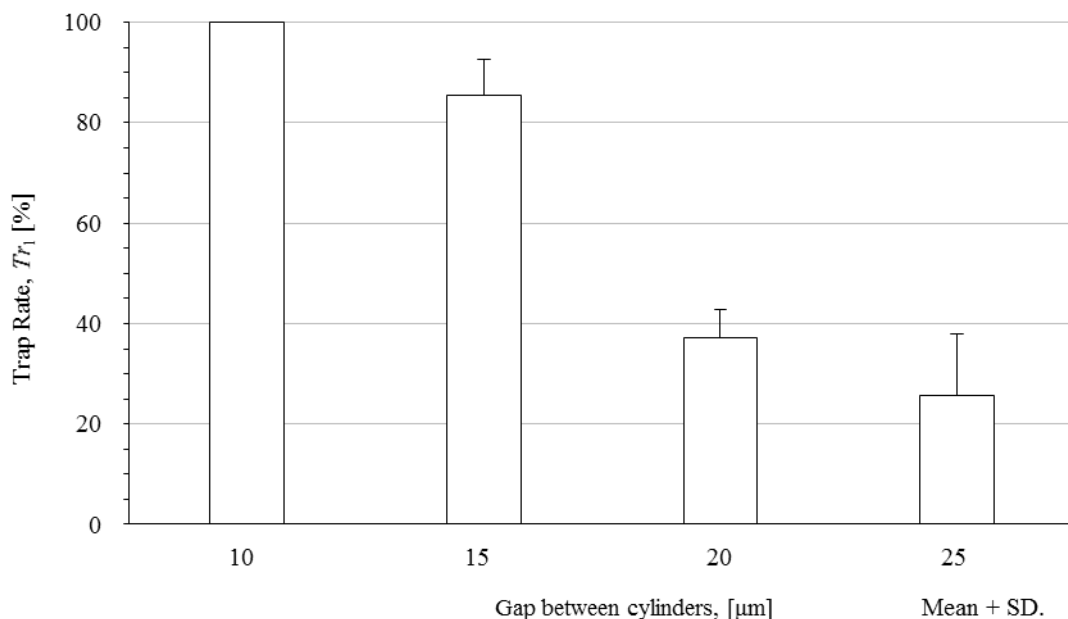


Fig. 3-14 各円柱隙間における Hepa1-6 の捕捉率.

続いて, 円柱間隙幅 15  $\mu\text{m}$  と 20  $\mu\text{m}$  における細胞の速度と捕捉率についての結果を示す (図 3-15). 円柱間隙幅 15  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$  どちらの結果においても細胞の速度が上昇することでトラップ率が上昇している. また, 細胞の速度が 600  $\mu\text{m/s}$  を下回ると基板に接着する細胞が現れた.

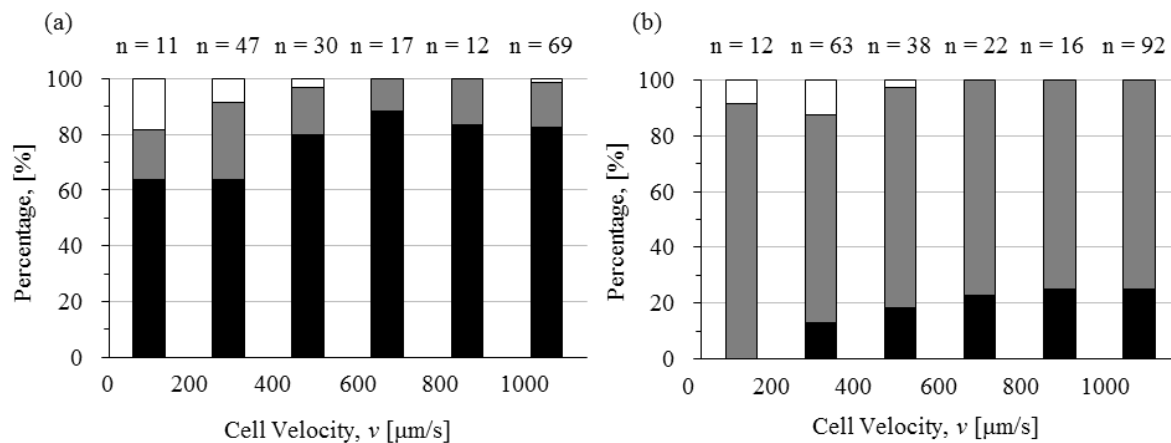


Fig. 3-15 円柱間隙幅 15  $\mu\text{m}$  と 20  $\mu\text{m}$  における細胞の速度と捕捉率, 通過率, 接着率. (黒) 捕捉率. (灰色) 通過率. (白) 接着率.

次に, それぞれのスリットに捕捉された細胞の直径を計測した結果を示す (図 3-16). 円柱間隙幅 10, 15  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$  における細胞の平均直径はそれぞれ, 11.9, 14.3, 15.4, 16.3  $\mu\text{m}$  となった. 円柱間隙幅 20  $\mu\text{m}$  と 25  $\mu\text{m}$  では有意な差が見られなかった.

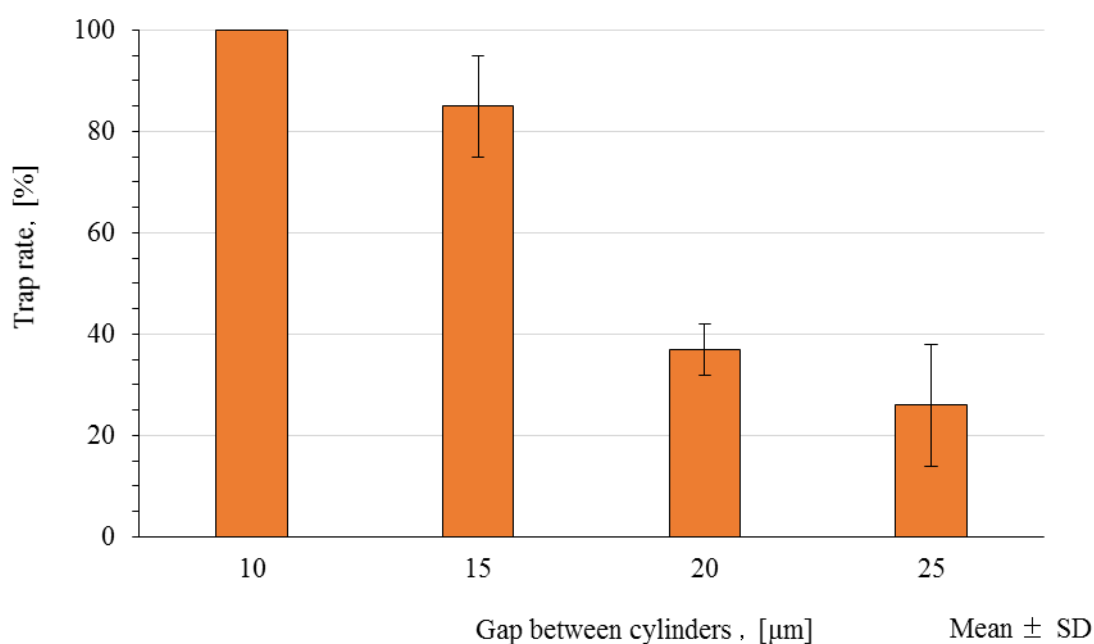


Fig. 3-16 各円柱間隙幅に捕捉された細胞の直径. (NS) 有意差なし.

最後に、ブタ血液と Hepa1-6 の混合液を用いた実験を行った。基本的にはどちらも単細胞の実験の時と同じ挙動を示した。円柱間隙に Hepa1-6 が捕捉されて狭くなっている隙間を、ブタ赤血球が通過する様子が確認された (図 3-17)。

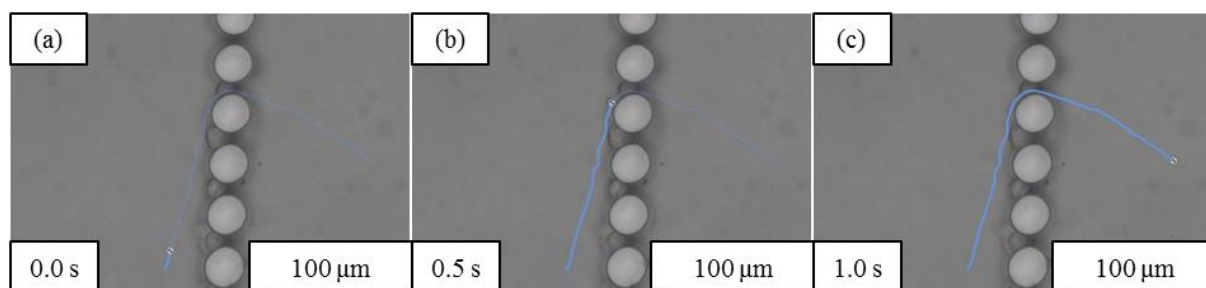


Fig. 3-17 Hepa1-6 とブタ血液の混合液による実験結果. (a) 0 秒後. (b) 0.5 秒後. (c) 1.0 秒後. (青線) ブタ赤血球の軌跡.

#### 3-2-4. 考察

本研究では、血液中から血中がん細胞の分離を行うことを目的としたデバイスを作製した。そして、マイクロ円柱パターンを一行に配置し、円柱間隙幅を 10, 15, 20, 25 μm で作製した。細胞はマウスのがん細胞 (Hepa1-6) とブタの血液を使用した。初めに作製したデバイスを用いて、ブタ赤血球と Hepa1-6 単体を用いてそれぞれの挙動について検討を行った。続いて、Hepa1-6 とブタ血液の混合液を用いて、実際に血液中から細胞を分離することができるか検討を行った。その結果、円柱間隙幅 10 μm を用いることで、Hepa1-6 の捕捉率がほぼ 100% であり、ブタ赤血球が通過する様子が確認できた。

高アスペクト比のマイクロパターンを作製するために、Ti マスクの作製を行った。しかし、SEM によって円柱の形状を観察した際に、円柱間隙幅が 10  $\mu\text{m}$  ではパターン上部が結合していた。これは、Ti 薄膜の膜厚が最適な値でなかったことが考えられる。今後は Ti マスクがフォトマスクとして有用であるか検討を行っていく必要がある。しかし、底面近くの間隙は一定であるため、実験自体は問題がなかったと考えられる。

流路実験を行う前に  $\text{O}_2$  プラズマ処理によって親水化処理を行った。親水化処理を行うことで、流路内に気泡が入ることがなく、実験を行うことができた。先行研究では、シリンジポンプによって流量を制御して評価を行っている<sup>[3], [4]</sup>。しかし、本研究で用いている流路デバイスは抵抗が高く、シリンジポンプでは流量の制御を行うことが困難であった。そのため、本研究では入口・出口の水頭差による流れを用いて実験を行った。この方法では、懸濁液の注入速度、注入量によって初期流速が異なる可能性が考えられる。本研究では、細胞懸濁液量はマイクロピペットを用いて一定体積を注入している。また、注入量は 30  $\mu\text{l}$  と少なく、およそ 1 滴程度である。そのため、注入速度はほぼ一定にすることが可能であった。一方で、生検トレパンを用いて流路の入口・出口を作製している。これらの位置によって流路抵抗が異なると考えられる。流路抵抗が変わることで流速が下がり、細胞の速度に影響を及ぼしてしまう。そこで、本研究では全ての細胞の速度を測定することで、流路抵抗に関する影響を除去した。

本研究ではブタ血液を 100 倍に希釈して実験に使用した。通常のブタ血液はヘマトクリット値が 40%程度とヒトとほぼ同様の値を示す。しかし、本研究で用いた希釈前のブタ血液（赤血球濃厚液）はヘマトクリット値がほぼ 100%であった。また、100 倍に希釈した試料ではヘマトクリット値が 1%程度となった。これは、ブタ血液を分注する際に懸濁が不足していたことが考えられる。そのため、赤血球以外の血液成分がほとんど得られなかったと考えられる。今後、白血球や血漿などの検討を行う際には注意する必要がある。しかし、本研究では、赤血球とがん細胞の比較を行うことが目的であったため、実験には影響がなかったと考えられる。

本研究では、Hepa1-6 の密度を 5000 cells/ $\text{cm}^2$  と固定して実験を行った。その結果、実験終了時にも細胞が捕捉されていない円柱間隙が存在しており、完全に目詰まりが起きることはなかった。目詰まりが起これしまうと、細胞懸濁液が流れなくなると考えられる。また、入口・出口の圧力差によっては、円柱間隙に捕捉されている Hepa1-6 に大きな力が生じてしまう可能性がある。先行研究では、がん細胞の変形能について報告をされている<sup>[6]</sup>。このことから、本研究で作製した流路デバイス内で目詰まりが起こった場合や、大きな圧力差を与えることで、細胞の変形が起こる可能性がある。そのため、今後は細胞の変形能についても検討していく必要がある。

本研究では種族の異なる 2 つのサンプル（ブタ血液とマウスのがん細胞）を用いている。細胞の直径は画像解析ソフト ImageJ を用いて、細胞の輪郭を囲うことで面積を計測し、計算によって直径を算出した。七条らは画像解析装置を用いて多種類の赤血球の計測を行っている<sup>[1]</sup>。結果として、ブタ血液の最大直径は 6~7  $\mu\text{m}$  であると報告しており、我々の行った測定方法では 5.4  $\mu\text{m}$  であった。これは、取得した画像の解像度の問題やフォーカスのずれによるものだと考えられる。一般的にヒトの赤血球の直径は約 7  $\mu\text{m}$  と言われており、本研究で計測したブタ赤血球よりも直径が 1.5  $\mu\text{m}$  ほど大きかった。また、Hepa1-6 の直径は平均 21  $\mu\text{m}$  であった。生物細胞の大きさは一

一般的には 20  $\mu\text{m}$  程度である．そのため，この計測法には問題がないと考えられる．そして，将来的にヒトへ応用するための前段階としては有用な実験サンプルであると考えられる．

本研究では，2 種類の細胞捕捉が観察された．一つは細胞の直径よりも小さな隙間に捕捉される様子である．もう一方は，細胞の直径よりも大きな隙間に捕捉される様子である．円柱間隙に捕捉された Hepal-6 の平均直径の計測を行ったところ，円柱間隙幅 10  $\mu\text{m}$ ，15  $\mu\text{m}$ ，20  $\mu\text{m}$ ，25  $\mu\text{m}$  でそれぞれ 11.9  $\mu\text{m}$ ，14.3  $\mu\text{m}$ ，15.4  $\mu\text{m}$ ，16.3  $\mu\text{m}$  となった．また，それぞれの円柱間隙に捕捉された細胞の最大直径をみると，10  $\mu\text{m}$  では 15.1  $\mu\text{m}$ ，15  $\mu\text{m}$  では 20.7  $\mu\text{m}$  であった（表 3-1）．このことから，流体の力によって細胞が自身よりも小さな隙間を変形し，通過したと考えられる．先行研究では，細胞の種類ごとにスリットを通過する様子を観察している<sup>[3],[4]</sup>．Hepal-6 ではないが，細胞は自身の直径よりも狭いスリットに入り込むことが観察されている．このことから，細胞にも変形能があると考えられる．今後は，細胞の変形能を計測することで，より効率的な細胞分離デバイスの作製を行う．また，細胞の種類ごとに変形能を調べることで，CTC と赤血球や白血球だけではなく，大きさの近い血管内皮細胞を分離することが可能なデバイスが作製できる可能性がある．一方で，円柱間隙に捕捉された細胞の最小直径をみると，10  $\mu\text{m}$  では 7.7  $\mu\text{m}$ ，15  $\mu\text{m}$  では 10.8  $\mu\text{m}$ ，20  $\mu\text{m}$  では 10.8  $\mu\text{m}$ ，25  $\mu\text{m}$  では 12.0  $\mu\text{m}$  であった．これは円柱間隙幅よりも小さい細胞が捕捉されていることが示されている．これは，細胞が円柱に接着していると考えられる．

Table 3-1 各スリットにおける捕捉された細胞の最大，最小直径． Unit:  $\mu\text{m}$ .

	10	15	20	25
Maximum diameter	15.1	20.7	24.9	27.2
Minimum diameter	7.7	10.8	10.8	12.0

そこで，細胞の接着を阻害するために，流路デバイスに親水化処理を施した後に，ウシ血清由来アルブミンを 30 分間コーティングした実験を行った．細胞懸濁液の導入体積を 60  $\mu\text{l}$  とし，C2C12 と Hepal-6 を用いて実験を行ったところ，いくつかの細胞が 15  $\mu\text{m}$  のスリットを変形をしながら通過する様子が観察できた（図 3-x）．そこで，細胞の直径とスリットの幅から細胞の変形率を以下の式で算出した．

$$DR = \frac{D}{S}$$

ここで， $DR$  は細胞の変形率， $D$  は細胞の直径， $S$  はスリットの幅である．すなわち， $DR=1$  のとき，細胞とスリットの幅が同等であり， $DR$  が大きくなるにつれて，細胞が大きく変形していることを示す．また，スリットを通過した細胞において，細胞がスリットに捕捉されてから通過するまでの時間を測定した．その結果，C2C12，Hepal-6 とともに正の相関があった．また，C2C12 は Hepal-6 よりも大きな変形でも通過時間が短い傾向にあった．これらのことから，細胞の変形能に違いがあることが示唆された．しかし，実験回数と測定できた細胞の数が少ないため，今後，実

験を重ねていく必要がある.

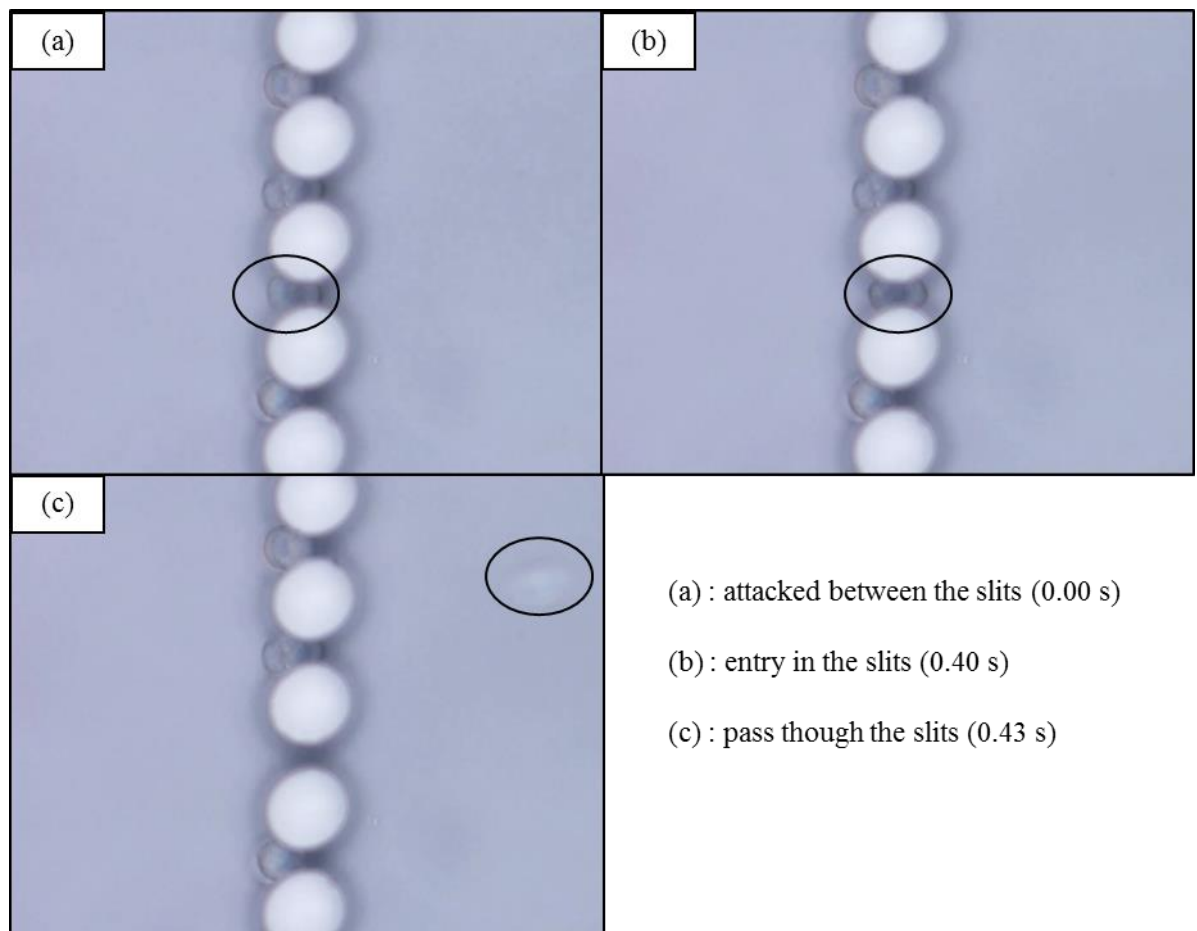


Fig. 3-18 細胞が円柱間隙を通過する様子. (a) : 細胞が円柱間隙に衝突した瞬間. (b) : 細胞が円柱間隙に進入する様子. (c) : 細胞が円柱間隙を抜けた後.

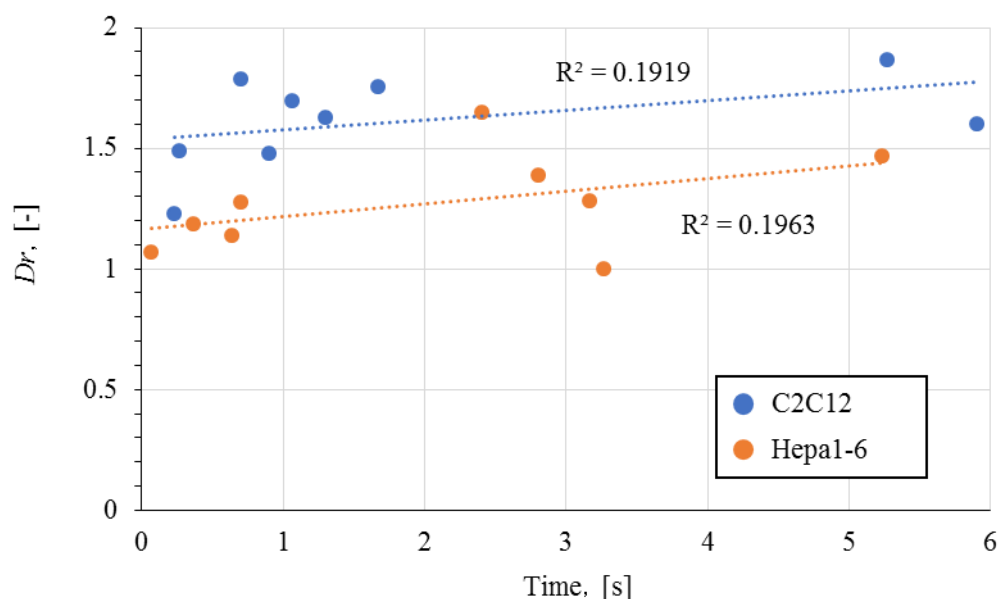


Fig. 3-19 C2C12 と Hepa1-6 の変形率と円柱間隙に衝突から円柱間隙を抜けるまでに要した時間の関係.

円柱間隙幅 10  $\mu\text{m}$ , 15  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$ , 25  $\mu\text{m}$  で Hepa1-6 はそれぞれ, 100%, 80%, 37%, 26% 捕捉された (図 3-14). これは, Hepa1-6 の平均直径が 21  $\mu\text{m}$  であることが原因として挙げられる (図 3-6). また, 各細胞の速度と捕捉率, 通過率, 接着率を評価した. 円柱間隙幅 15  $\mu\text{m}$ , 20  $\mu\text{m}$  では細胞の速度が上がるにつれて細胞の捕捉率が上がる傾向にあった (図 3-15). これは, 細胞が粘弾性体であることが挙げられる. 細胞の速度が上がることで, 細胞が円柱を避けきれずに衝突する. そして, 細胞の粘性の影響によって, 変形までに時間がかかる. その間に細胞が円柱に接着し, 捕捉率が向上したと考えられる. また, 細胞の速度が 600  $\mu\text{m/s}$  を下回ると, 基板に接着する細胞が現れた. これは, マイクロ流路デバイスに細胞接着阻害のコーティングを施さなかったことが原因として挙げられる. これらのことから, Hepa1-6 は円柱間隙に捕捉されることで, 円柱または円柱近傍の底面に接着していると考えられる. 今後は細胞の接着力についても検討を行う必要がある.

Hepa1-6 とブタ血液を混合した懸濁液を使用して実験を行った. ブタ赤血球は Hepa1-6 が捕捉されている円柱間隙を通過する様子が観察された (図 3-17). これは, Hepa1-6 の直径が 21  $\mu\text{m}$  であることに對して, 円柱の高さが約 60  $\mu\text{m}$  あるため, その隙間を通過していると考えられる. Hepa1-6 の濃度が低ければ, 円柱間隙に目詰まりが起こらず, 血液中から Hepa1-6 を分離することが可能であることが示唆された. しかし, 血液中には赤血球以外にも白血球が存在している. 本研究では, 血液を Hepa1-6 の懸濁液と混合しているため, 白血球はほとんど観察されなかった. 今後は血中から白血球を分離して検討を行う必要がある.

先行研究では矩形スリットを用いて神経芽細胞腫と血液の分離を行っている<sup>16)</sup>. この研究では長さを有したマイクロ流路デバイスを用いて実験を行っている. マイクロスリットに長さを与えることで流路全体の抵抗が上昇してしまう可能性がある. また, 細胞はスリットに侵入した後,



スムーズにスリットを通過する<sup>[1]</sup>。そのため、先行研究と比較して円柱スリットは流路抵抗が低く、将来的には分離速度も高くなる可能性がある。また、本研究では肝臓由来がん細胞を用いて実験を行った。血中循環がん細胞には様々な組織由来のがん細胞が循環している可能性があり、由来の組織によって物理的特性が異なる可能性がある。そのため、様々な組織由来のがん細胞を調べることはとても重要である。今後は他の組織由来のがん細胞について検討することで、さらにスリットを有したマイクロ流路デバイスの有用性について検討を行っていく。

3 章で作製したマイクロ流路デバイスは大きさの異なる細胞の分離は可能であった。血液中からがん細胞を分離することは、がん診断として有用である。がん患者は健常人と比較して、CTC の濃度が高いことが報告されている。そのため、がん診断の第一歩として、使用することができると考えられる。しかし、がん細胞の DNA 解析などを行うためには、捕捉した細胞を回収する必要がある。回収システムについては図 3-9 に示したように、壁面にサブ流路を作製することで、回収が可能であると考えられる。このシステムが完成することで、簡易的ながん診断が可能であり、また、がん細胞の特徴を調べることで、治療方法を決定するうえでの指標となり得る。

### 3-2-5. 結言

がん診断に使用することが期待されている血管循環がん細胞を捕捉することを目的とし、ブタ赤血球から Hepa1-6 を分離するデバイスを考案した。マイクロ円柱パターンを複数配置し、10, 15, 20, 25 $\mu\text{m}$  の幅を有するマイクロスリットを作製した。水頭差 100 Pa 以下において、ブタ赤血球は 10 $\mu\text{m}$  のスリットを難なく通過する様子が確認できた。一方で、Hepa1-6 (マウス肝がん由来がん細胞)は 10 $\mu\text{m}$  スリットでは 100%捕捉することができた。また、スリットに捕捉された Hepa1-6 の直径を測定したところ、10, 15, 20, 25 $\mu\text{m}$  のスリットでそれぞれ、という結果が得られた。また、15, 20 $\mu\text{m}$  スリットにおいて、細胞の速度と捕捉率について検討を行ったところ、細胞の速度が高いほど、細胞が捕捉される傾向にあった。最後に、ブタ赤血球と Hepa1-6 の混合液を作製し、実験を行ったところ、Hepa1-6 が捕捉されているスリットにおいてもブタ赤血球が通過することを確認した。これらのことから、このデバイスは将来的にがんの診断デバイスとして有用であると考えられる。

### 参考文献

- [1] 七條喜一郎, 郷田賢二, 豊澤敬一郎, 鈴木實, 画像処理装置による家畜の赤血球計測に関する研究, 鳥取大学農学 部研究報告, Vol. 40, No. 11 (1987), pp. 161-167.
- [2] Nagrath, S., Sequist, L. V., Maheswaran, S., Bell, D. W., Irimia, D., Ulkus, L., Smith, M. R., Kwak, E. L., Digumarthy, S., Muzikansky, A., Ryan, P., Balis, U. J., Tompkins, R. G., Haber, D. A. and Toner, M., Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology, *Nature*, Vol. 450, No. 7173 (2007), pp. 1235-1239.
- [3] 厚生労働省, 参考資料 がん対策 (online), available from <<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2009/12/dl/s1216-9g01.pdf>> (参照日 2016 年 2 月 14 日).
- [4] Hashimoto, S., Horie, T., Sato, F., Yasuda, T. and Fujie, H., Behavior of cells through micro slit,

Proceedings of 17th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol. 1 (2013), pp. 7-12.

- [5] Mizoi, A., Takahashi, Y., Hino, H., Hashimoto, S. and Yasuda, T., Deformation of cell passing through micro slit, Proc. 19th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol. 2 (2015), pp. 270-275.
- [6] Hou, H. W., Li, Q. S., Lee, G. Y. H., Kumar, A. P., Ong, C. N. and Lim, C. T., Deformability study of breast cancer cells using microfluidics, Biomedical Microdevices, Vol. 11, No. 3 (2009), pp. 557-564.
- [7] Mohamed, H., McCurdy, L. D., Szarowski, D. H., Duva, S., Turner, J. N. and Caggana, M., Development of a rare cell fractionation device: application for cancer detection, IEEE Transactions on Nanobioscience, Vol. 3, No. 4 (2004), pp. 251-256.
- [8] Cristofanilli, M., Budd, G. T., Ellis, M. J., Stopeck, A., Matera, J., Miller, M. C., Reuben, J. M., Doyle, G. V., Allard, W. J., Terstappen, L. W. M. M. and Hayes, D. F., Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer, New England Journal of Medicine, Vol. 351, No. 8 (2004), pp. 781–791.

## 4 章. 平行平板間スリットにおける細胞の変形・通過挙動

### 4-1. 背景

3 章ではマイクロ円柱を複数配置し、複数の幅のスリットを作製した. 作製したデバイスによって細胞の捕捉率の違いを検出することに成功した. また, スリットの幅を変えることで, 細胞の大きさごとに分離するフィルタとしての役割があることも示した. 4 章では 2 つのマイクロパターンを組み合わせ, 平行平板スリットを作製し, 細胞の変形率とスリット通過時の速度変化に着目した.

### 4-2. 方法

#### 4-2-1. 細胞懸濁液作製

4 章では, マウス横紋筋由来筋芽細胞 (C2C12), マウス肝がん由来がん細胞 (Hepa1-6), マウス頭蓋冠由来骨芽細胞 (MC3T3-E1) の 3 種類の組織由来の細胞を使用した. 全ての細胞は D-MEM 基礎培地にウシ胎児血清 (FBS) と抗生物質 (P/S) をそれぞれ 10%, 1% 添加した培地によって培養した. 細胞がサブコンフルエントまで増殖したところで, トリプシン処理によって細胞を剥離させた. そして, トリプシンの効果を止めるため, かつ細胞懸濁液の密度を調整するために, 培地を追加した. ブタ血液を生理食塩水によって 1000 倍に希釈した懸濁液を作製した.

#### 4-2-2. 横型マイクロスリット

##### 4-2-2-1. 横型マイクロスリットの設計

横型マイクロスリットは上部基板と下部基板を組み合わせで作製した. 上部基板は幅 2 mm, 長さ 30 mm とし, 中央を 100  $\mu\text{m}$  で区切っている. 下部基板は高さ 10  $\mu\text{m}$  でパターンを作製した. これらの基板を組み合わせることで, 横型マイクロスリットが作製される. 横型マイクロスリットの高さは下部基板に作製したパターンの高さに依存する. 本研究では, スリットの高さが 10  $\mu\text{m}$  となるように設計した (図 4-1).

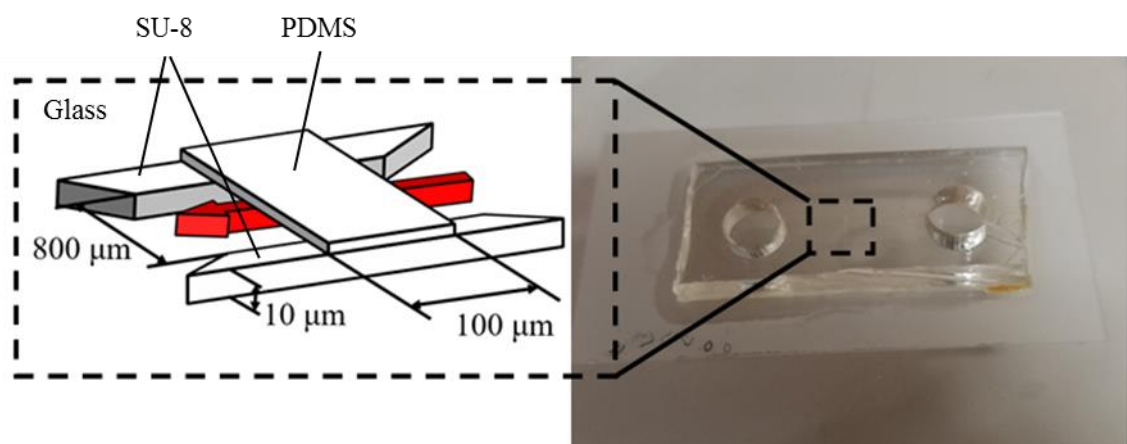


Fig. 4-1 平行平板スリットの概要.

#### 4-2-2-2. 横型マイクロスリットの作製

初めに、上部基板を作製した。上部基板はチタンガラスを使用したフォトマスクの作製、上部用の型の作製、PDMS に転写の順に作製を行った。スライドガラスを半分にカットし、アルカリ洗浄液に 10 分間浸漬した後、純水で十分にリンスした。続いて、洗浄したガラス基板に電子ビーム蒸着装置によってチタン薄膜を 200 nm 蒸着した。続いて、O<sub>2</sub> プラズマアッシング (100 W, 5 分) を行った。直ちに、HMDS を本速 3000 rpm でスピコートし、続けて、ポジ型レジスト剤 (OFPR-800) を本速 7000 rpm でスピコートした。次に、95°C のホットプレート上で 3 分間ソフトベークした。露光にはレーザ直接描画装置を用いた。レーザの軌道が露光されパターンとなる。露光後に現像液 (NMD-3) に浸漬し、純水で十分にリンスした。枚葉式スピンドライヤで乾燥させた後、金属顕微鏡によってパターンの現像度を確認し、十分に現像されていることを確認した後に、ドライエッチングを行った。チタンはフッ素系のガスを使用することでエッチングすることが可能である。本研究では、SF<sub>6</sub> と Ar の混合ガスを使用してドライエッチングを行った。

続いて、上部用の型の作製方法を示す。初めに、半分にカットしたスライドガラスを上記と同様の手順で洗浄した。洗浄したガラス基板に O<sub>2</sub> プラズマアッシング (100 W, 5 分) 処理を施した。直ちに、ネガ型レジスト剤 (SU-8 10) を本速 1000 rpm でスピコートした。ソフトベークは 65°C, 95°C のホットプレート場でそれぞれ、2 分, 7 分間行った。ソフトベーク後に作製したフォトマスクを用いて片面マスクアライナでパターンを露光した。この時、Dose 量は 300 mJ/cm<sup>2</sup> とした。PEB は 65°C, 95°C のホットプレート上でそれぞれ 1 分, 5 分間行った。そして、現像液 (SU-8 Developer) に浸漬することでパターンの現像を行った。現像後、IPA, 純水の順にリンスし、枚葉式スピンドライヤで乾燥させた。

作製した型を以下の手順で PDMS へ転写した。主剤と硬化剤を体積比 10:1 で十分に混合し、真空デシケータ内で脱気した。PDMS がこぼれないように作製した型にポリイミドテープを巻きつけた。脱気した PDMS を作製した型に流し込み、100 度のオーブン内で 1 時間焼結させた。型から PDMS を剥離させ、流路の端に直径 8 mm の孔を 2 つ作製した。

続いて、下部基板を作製した。下部基板はチタンガラスを用いたフォトマスクを作製し、スライドガラスにネガ型レジスト剤によってパターンを作製した。フォトマスクの作製手順は上記と同様の手順である。すなわち、洗浄したガラス基板を 2 枚用意し、1 枚はチタンを蒸着した後に、パターン形状をエッチングすることで、フォトマスクとした。他方のガラス基板は O<sub>2</sub> アッシング後にネガ型レジスト剤 (SU-8 10) を本速 2000 rpm でスピコートした。ソフトベークは 65°C, 95°C のホットプレート上でそれぞれ 3 分, 7 分間行った。作製したフォトマスクを用いて片面マスクアライナによってパターンの露光を行った。この時、Dose 量は 300 mJ/cm<sup>2</sup> である。PEB は 65°C, 95°C のホットプレート上でそれぞれ、1 分, 5 分間行った。PEB 後に、現像液 (SU-8 Developer) に浸漬することで、パターンの現像を行った。現像後、IPA, 純水の順にリンスした。作製したマイクロパターンの高さは接触式段差計を用いて測定した結果、高さは約 10.5 μm であった。

次に、上部基板と下部基板の接着を強固に行うための処理を施した。上部基板を IPA で洗浄し、純水でリンスした後、枚葉式スピンドライヤで乾燥させた。続いて、SU-8 と PDMS の接着を強固にするため、Ren らの方法を参考にした<sup>[1]</sup>。O<sub>2</sub> プラズマアッシング (50 W, 30 秒) 行い、APTES

に 5 分間浸漬することで，上部基板表面にアミノ基を付加した．純水で十分にリンスし，65℃のオーブン内で乾燥させた．上部基板と下部基板を接着し，重りを乗せた状態で 65℃のホットプレート上で 5 分間接着させた．

#### 4-2-3. 流路実験方法

流路実験システムの概要を図 4-2 に示す．流路実験システムはマイクロ流路デバイス，位相差顕微鏡，デジタルカメラで構成される．倒立方位相差顕微鏡にマイクロ流路デバイスをセットし，接眼レンズ越しにセットしたデジタルカメラによって，動画を撮影した．

細胞は入口と出口の水頭差を用いた方法で流路内に流入させた．初めに，マイクロ流路デバイスの親水性を向上させるために，O<sub>2</sub> アッシング処理（100 W，1 分）を行った．直ちに，4%BSA でマイクロ流路デバイス内を満たした．BSA は細胞の特異的接着を抑制する効果があり，流路内に細胞が接着しないようにする効果がある．BSA を注入後，30 分間生体環境内でインキュベートした．30 分後，流路内を生理食塩水によって洗浄し，細胞懸濁液を注入した．細胞懸濁液はマイクロピペットを用いることで，体積を一定に注入することが可能である．

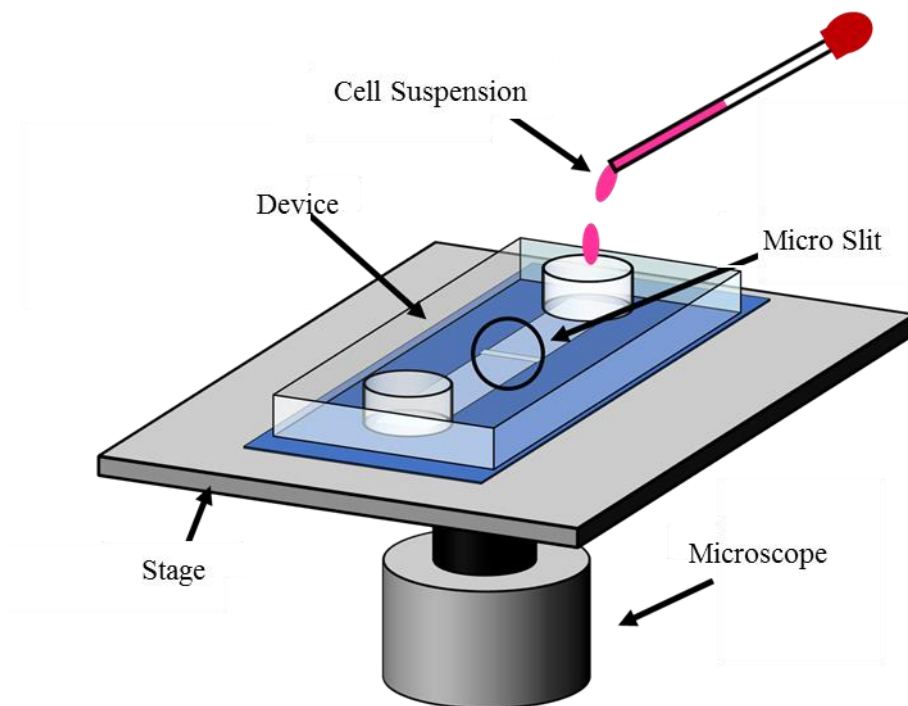


Fig. 4-2 実験方法の概要図．流路デバイスを位相差顕微鏡にセットし，細胞懸濁液をマイクロピペットを使用して流路内に注入する．

本研究では，入口と出口の圧力差を 50 Pa となるようにした．入口と出口の圧力差は水頭差と培地の密度で表すことができる．

$$\Delta P = \rho g \Delta h$$

ここで、 $\Delta P$  は入口と出口の圧力差、 $\rho$  は培地の密度、 $\Delta h$  は入口と出口の水頭差、 $g$  は重力加速度である。マイクロ流路デバイスの入口と出口の孔より、水頭差は以下の式で表すことができる。

$$\Delta h = \frac{4V}{\pi d^2}$$

ここで、 $V$  は注入する細胞懸濁液の体積、 $d$  は入口の孔の径である。細胞懸濁液を注入する直前にデジタルカメラの動画撮影を開始した。デジタルカメラの動画は細胞の輪郭を捉えるために、シャッタースピードを  $2000 \text{ s}^{-1}$  とした。フレームレートは  $30 \text{ fps}$  である。

#### 4-2-4. 評価方法

横型マイクロスリットは作製した後のスリットの高さを測定することが困難である。そのため、マイクロスリットよりも小さな粒子を用いて、マイクロスリットの高さを推定した。連続の式より、流路内の流量は一定である。

$$v_1 A_1 = v_2 A_2$$

ここで、 $A_1$  はマイクロスリット外の断面積、 $v_1$  はマイクロスリット外の細胞の速度、 $A_2$  はマイクロスリット内の断面積、 $v_2$  はマイクロスリット内の細胞の速度である。

次に、マイクロスリットを通過した細胞の面積を測定した。マイクロスリット通過前の細胞の面積とマイクロスリット通過中の細胞の面積を画像解析ソフトウェア (ImageJ) によって測定した。細胞の変形率はマイクロスリット内外の細胞の面積を用いて以下の式で定義した。

$$DR = \frac{A_2}{A_1}$$

ここで、 $DR$  は細胞の変形率、 $A_1$  はマイクロスリット外の細胞の面積、 $A_2$  はマイクロスリット内の細胞の面積である。

細胞の速度は撮影した動画からモーション追跡ソフトウェア (Kinovea) を利用して測定した。Kinovea は 1 フレームごとに細胞の座標を得る事ができる。本研究では、マイクロスリットの手前  $100 \mu\text{m}$  の位置の細胞の 10 フレームの細胞の速度の平均とマイクロスリット内の平均速度を算出した。細胞の速度比は以下の式で定義した。

$$VR = \frac{v_2}{v_1}$$

ここで、 $VR$  は速度比、 $v_1$  はマイクロスリット外の細胞の速度、 $v_2$  はマイクロスリット内の細胞

の速度である.

#### 4-3. 結果

初めに, マイクロスリット内外の赤血球の速度を測定した結果を図 4-3 に示す. 実験には水頭差を利用しているため, 赤血球の速度は徐々に低下していく. また, どの速度域においてもマイクロスリット内外の速度には相関があり, 傾きはおよそ 10 であった.

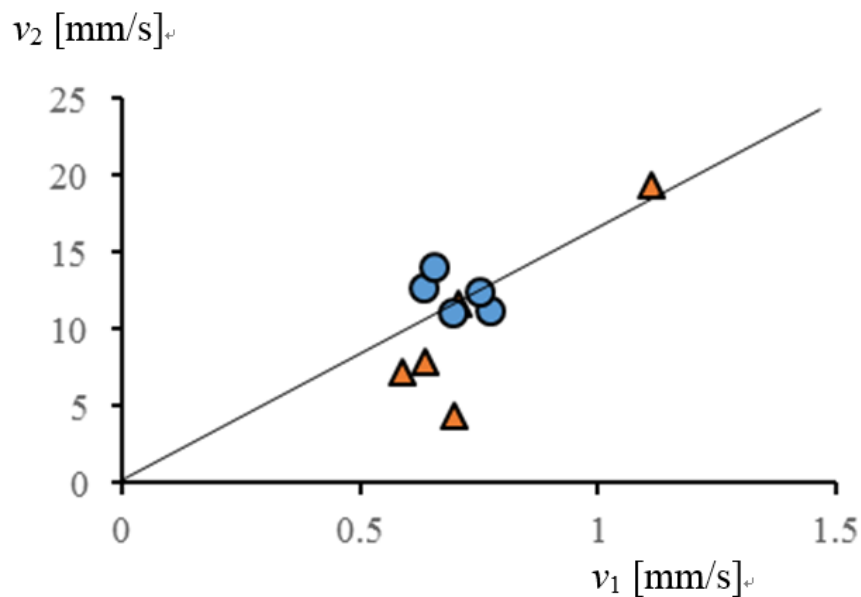


Fig. 4-3 ブタ赤血球のスリット外速度( $v_1$ )とスリット内速度( $v_2$ )の相関

続いて, 細胞のマイクロスリット内外の細胞の面積を測定した結果を図 4-4 に示す. スリット内の細胞の投影面積は C2C12, Hepa1-6, Neuro2a それぞれ  $424 \mu\text{m}$ ,  $431 \mu\text{m}$ ,  $436 \mu\text{m}$  であった. また, スリット内の細胞の投影面積はそれぞれ,  $481 \mu\text{m}$ ,  $478 \mu\text{m}$ ,  $500 \mu\text{m}$  であった. すべての細胞において, マイクロスリット内の細胞の面積が大きいことが示された.

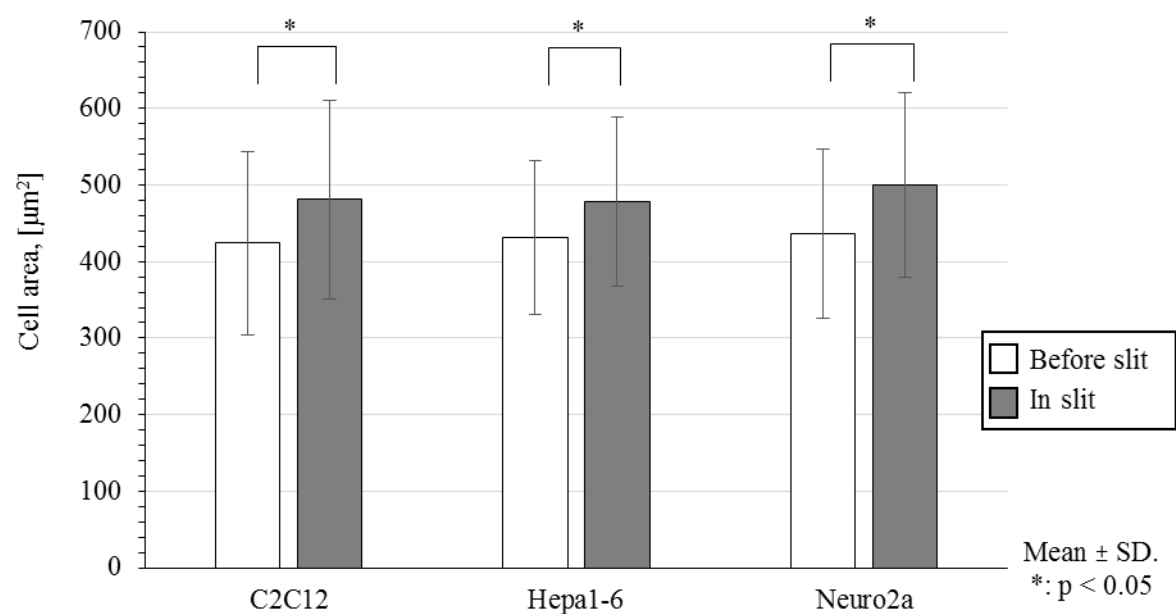


Fig. 4-4 C2C12, Hepa1-6, Neuro2a のスリット内とスリット外の投影面積.

次に、各細胞の変形率を図 4-5 に示す．変形率はマイクロスリット内外の面積比で表される．C2C12, Hepa1-6, Neuro2a の面積比はそれぞれ、1.15, 1.11, 1.15 となった．細胞の種類において、マイクロスリット内の変形率に大きな差はなかった．

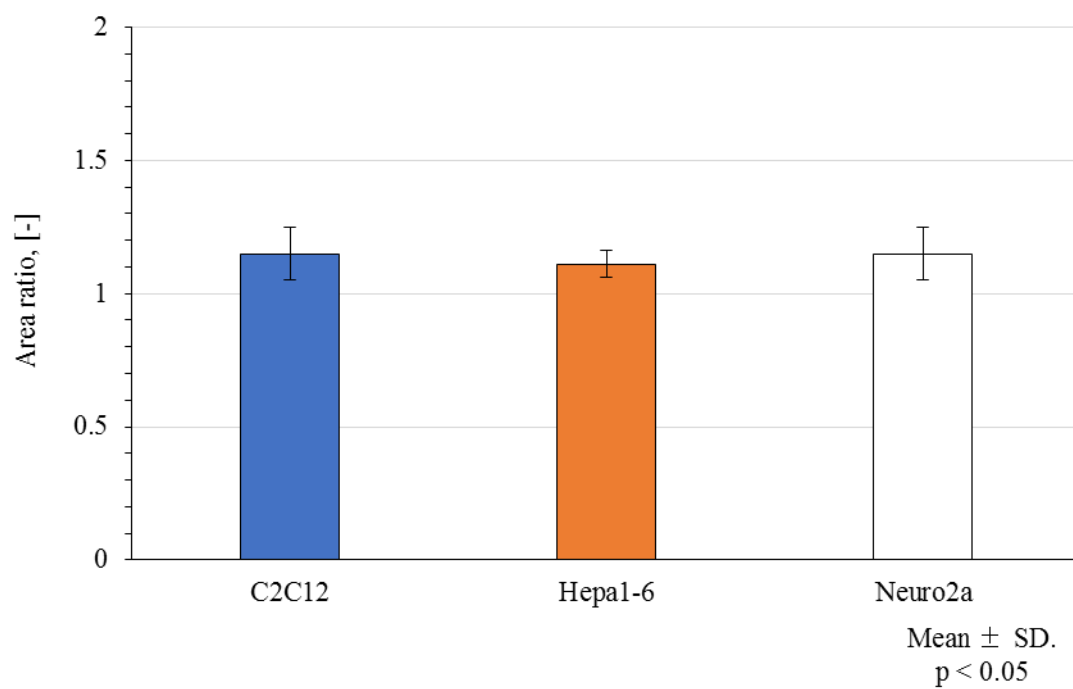


Fig. 4-5 C2C12, Hepa1-6, Neuro2a の変形率.



続いて、マイクロスリット内外における細胞の速度の測定結果を図 4-6 に示す。C2C12 の平均速度はスリット外で  $68 \mu\text{m/s}$ 、スリット内で  $361 \mu\text{m/s}$  であった。Hepa1-6 の平均速度はスリット外で  $240 \mu\text{m/s}$ 、スリット内で  $612 \mu\text{m/s}$  であった。そして、Neuro2a の平均速度はスリット外で  $43 \mu\text{m/s}$ 、スリット内で  $153 \mu\text{m/s}$  であった。すべての細胞種において、スリット内の速度が高い傾向にあった。Hepa1-6 のみ、平均速度が高い結果となった。

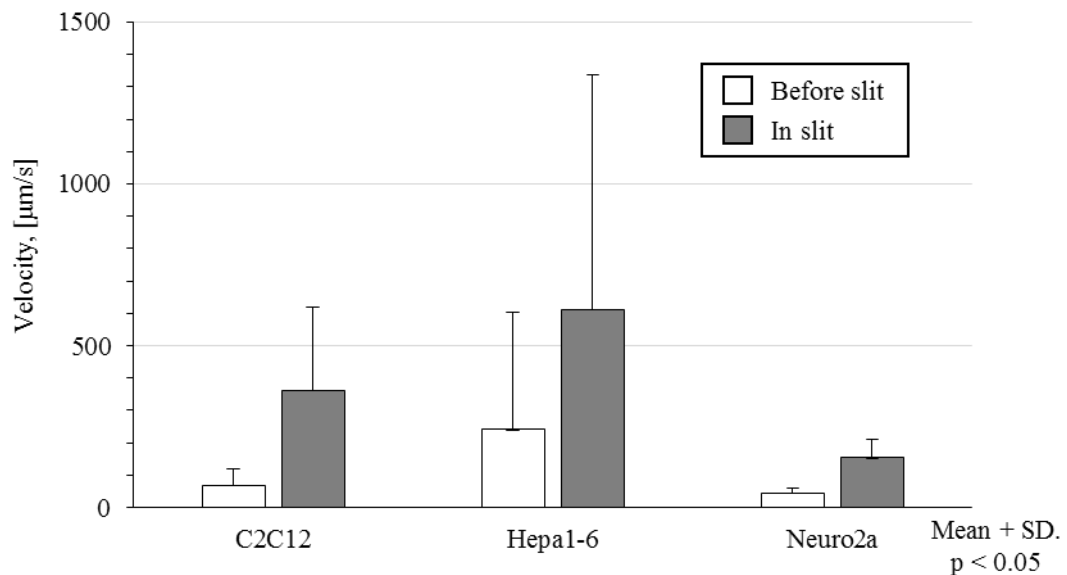


Fig. 4-6 C2C12, Hepa1-6, Neuro2a のスリット外、スリット内における細胞の速度平均

次に、各細胞のスリット内、スリット外の平均速度から速度比を算出した結果を図 4-7 に示す。速度比はスリット内の速度とスリット外の速度の比で表される。C2C12, Hepa1-6, Neuro2a の速度比はそれぞれ、3.02, 2.89, 2.82 となり、C2C12 の速度比が高い傾向にあった。しかし、細胞間に有意差な差は認められなかった。

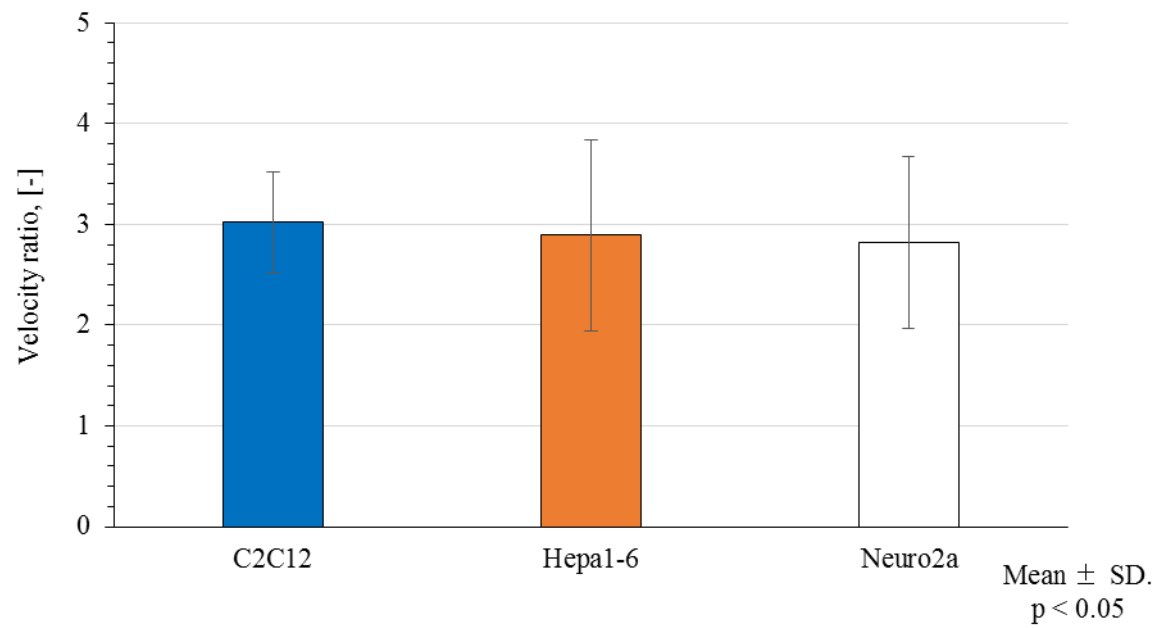


Fig. 4-7 C2C12, Hepa1-6, Neuro2a の速度比

最後に、細胞のスリット外の投影面積と速度変化率の関係を図 4-8, 図 4-9, 図 4-10 に示す。細胞変形率と速度変化率の相関係数は C2C12, Hepa1-6, Neuro2a それぞれ 0.096, 0.369, 0.082 であり、細胞の投影面積と速度比に相関関係は認められなかった。

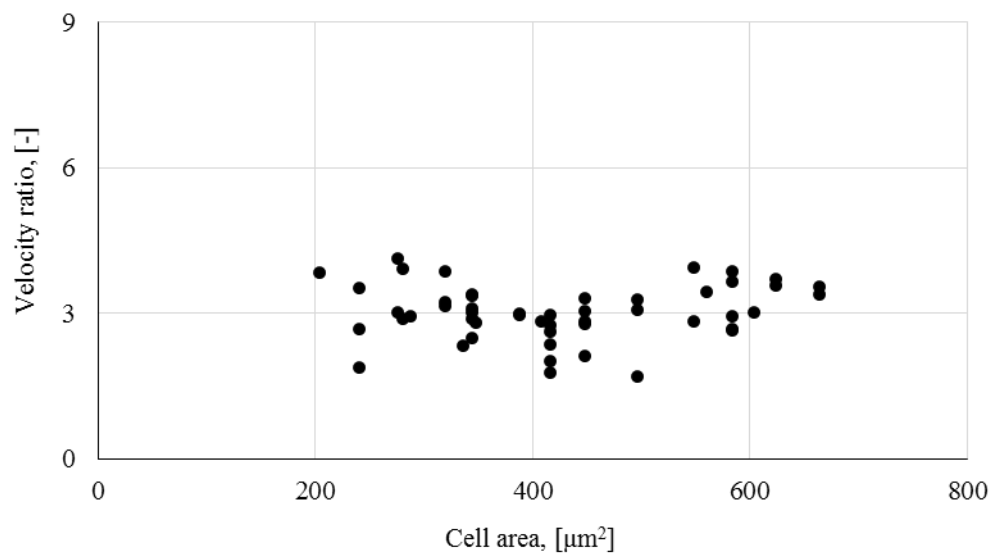


Fig. 4-8 C2C12 のスリット前投影面積と速度比の関係。

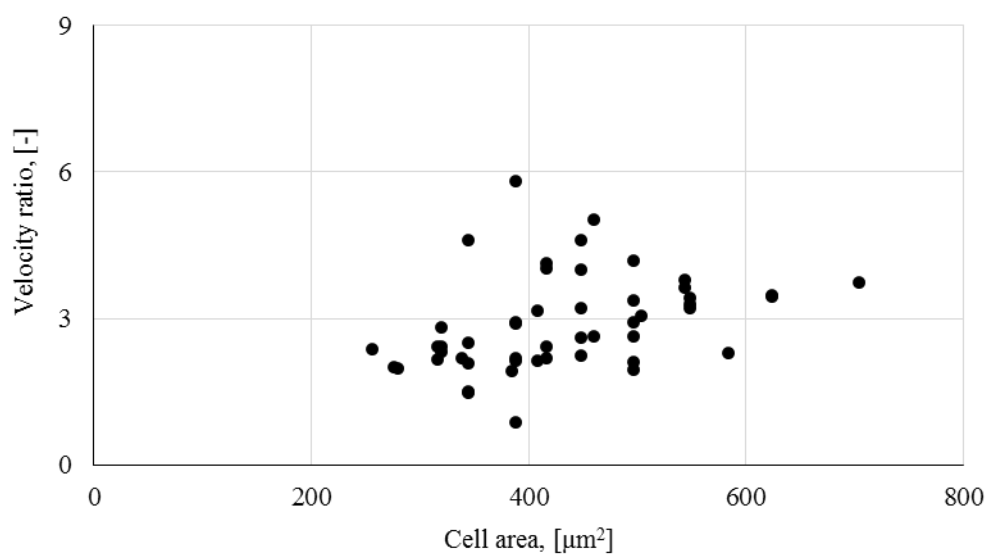


Fig. 4-9 Hepa1-6 のスリット前投影面積と速度比の関係

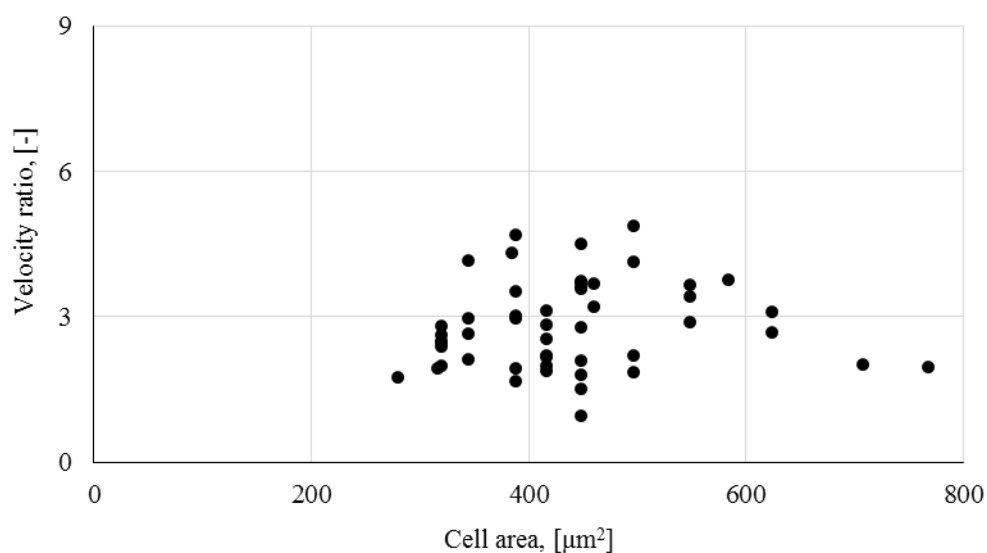


Fig. 4-10 Neuro2a のスリット前投影面積と速度比の関係

#### 4-4. 考察

##### 4-4-1. 4 章の考察

本章では、2 つの基板を組み合わせることで鉛直方向の細胞の変形を観察することのできる平行平板スリットを作製した。低圧力状態において、細胞がスリットを通過するときの挙動を位相差顕微鏡およびデジタルカメラによって観察した。その結果、3 種類の細胞において、スリット内の細胞の面積の増加と速度の減少が観察された。

本実験で得られた結果より、レイノルズ数を算出した。レイノルズ数は以下の式で表される。

$$Re = \frac{UL}{\nu}$$

ここで、 $Re$  はレイノルズ数、 $U$  は代表速度、 $L$  は代表長さ、 $\nu$  は液体の動粘度である。代表速度を本実験で得られた細胞の最大速度( $U=1100\text{ }\mu\text{m/s}$ )、代表長さを流路の高さ( $L=60\text{ }\mu\text{m}$ )とし、液体の動粘度は水と同等と考える。すると、 $Re=0.07$  となり、流路内の流れは層流であると想定することができる。また、スリット前後にも流れの剥離がないと考えられる。また、動画からもスリット近傍において、細胞がスリットに向かって直線的に流れることも確認できている。

本研究で使用した流路デバイスはスリット部分の断面積が小さく、流路抵抗が非常に大きくなっている。また、上部基板で使用している PDMS は疎水性材料であるため、通常は流路内部へ流体を流し込むことはできない。本研究では、流路デバイスに  $\text{O}_2$  プラズマ処理を施すことで、流路全体の親水性を向上させた。また、下部基板で使用しているガラスや SU-8 は細胞が容易に接着することのできる材質である。3 章で Hepa1-6 は速度が  $600\text{ }\mu\text{m/s}$  以下であると基板に接着する可能性があることを報告している。本実験ではスリット外の平均速度は  $200\text{ }\mu\text{m/s}$  と非常に低い値となっている。そこで、実験前に 4% ウシ血清由来アルブミン (BSA) を流路内に注入し、30 分間静置することで、細胞の接着を防ぐことに成功し、細胞がスリット内へ侵入する様子を確認することができた。また、3 章では  $100\text{ Pa}$  以下の圧力差であると、細胞は  $10\text{ }\mu\text{m}$  のスリットを通過することとはなかった。これらのことから、BSA コーティングの有用性が確かめられた。

本研究で作製した流路デバイスは上下基板を組み合わせで作製している。そのため、組み合わせ後のスリット幅を観察することは困難である。そのため、作製したデバイスを用いてブタ血液を用いることで、スリットの高さを算出することを試みた。その結果、比例定数 (速度比) が約 10 となった。連続の式より、理論値を算出すると速度比は 13 となるため、実際に作製した流路デバイスのスリットは作製した下部基板のマイクロパターンよりも広がっていると予測される。実際に連続の式を用いて計算すると、スリットの幅は約  $13\text{ }\mu\text{m}$  となった。

一方で、本実験で使用した 3 種類の細胞はいずれもスリット内における投影面積がスリット外における投影面積よりも大きく、変形率は 1 以上となった。このことから、細胞はスリット内に扁平して侵入していることが予測される。また、細胞の体積が一定であると仮定すると、スリット内外の体積は以下の式で表される。

$$V_{\text{cell}} = \frac{1}{6}\pi D_1^3 = \frac{1}{4}\pi D_2^2 h$$

ここで、 $D_1$  はスリット外の細胞の直径、 $D_2$  はスリット内の細胞の直径、 $h$  はスリットの高さである。細胞の体積からスリット高さを算出すると、 $12.1\text{ }\mu\text{m}$  となる。赤血球サンプルを測定し、連続の式で算出したスリットの高さは  $13\text{ }\mu\text{m}$  であり、同等の値を示したと考えられる。これは、マイクロスリット近傍において、PDMS と SU-8 の接着力が不足しており剥離している可能性が考えられる。これは、上下スリットの接着面積が  $300\text{ }\mu\text{m}\times 100\text{ }\mu\text{m}$  と小さいことが原因として挙げられる。本研究では、すべての実験において、同等のスリット幅が得られていたため、結果に問題はないと考えられる。

図 4-6 に示したように、C2C12, Hepa1-6, Neuro2a の平均速度はスリット外において、それぞれ

68  $\mu\text{m/s}$ , 240  $\mu\text{m/s}$ , 43  $\mu\text{m/s}$ , スリット内において、それぞれ、361  $\mu\text{m/s}$ , 612  $\mu\text{m/s}$ , 153  $\mu\text{m/s}$ であった。Hepa1-6 の平均速度が C2C12 と Neuro2a の平均速度の 2~3 倍の値となった。これは、水頭差を用いた実験方法による誤差であると考えられる。水頭差を用いることで、初期速度が最大となり、時々刻々と速度が減少する。このとき、Hepa1-6 は実験開始から早い段階の細胞を測定したと考えられる。今後は圧力一定の条件下で実験を行う必要がある。

図 4-7 に示したとおり、C2C12, Hepa1-6, Neuro2a において平均の速度比はそれぞれ、3.02, 2.89, 2.82 となり、C2C12 の速度比が高い傾向にあった。3 章では C2C12 と Hepa1-6 のスリット捕捉率を測定しており、その結果、20  $\mu\text{m}$ , 30  $\mu\text{m}$  のスリットにおいて C2C12 の捕捉率が高かった。また、図 3-19 に示したように、Hepa1-6 と C2C12 の変形率とスリット進入時間に差が見られた。つまり、C2C12 は Hepa1-6 と比較して弾性率が低いことが考えられる。スリット内に侵入した場合、細胞には壁面から摩擦力が作用する。この時、摩擦力は以下の式で考えることができる。

$$F = \mu N$$

ここで、 $F$  は摩擦力、 $\mu$  は摩擦係数、 $N$  は垂直抗力である。摩擦係数はスリットの粗さや細胞膜松浪ガラスがすべての細胞に使用している流路デバイスは同様の方法で作製しているため、表面粗さなどに違いはないと考えられる。また、細胞表面に存在する接着性タンパク質は実験直前に BSA によって特異的吸着を阻害しているため、影響は少ないと考えられる。細胞の弾性率が高いと垂直抗力が大きくなり、摩擦係数が大きくなることが予測される。すなわち、細胞の弾性率が高い細胞は弾性率の低い細胞よりもスリット内の細胞の速度が遅くなることが考えられる。この差が得られなかった原因として、スリットの長さが短かったことが考えられる。つまり、細胞が加速するための助走区間がなかったこと、細胞が 0.1 秒程度でスリットを通過してしまうため、本研究で使用したカメラでは、3 フレームほどの画像で評価をしているため、誤差が大きくなっていることが考えられる。

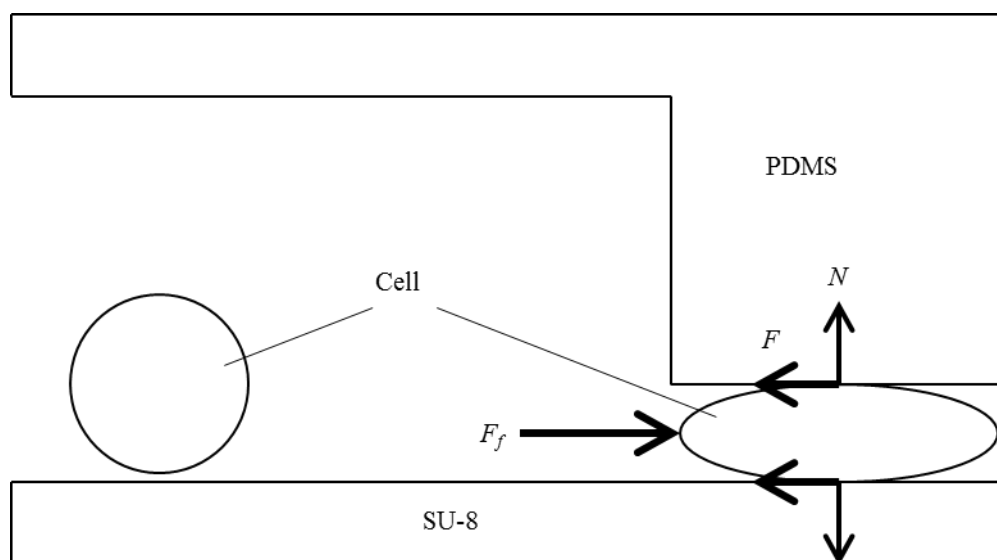


Fig. 4-11 スリット内の細胞の力の釣り合い.

また、細胞がスリットに捕捉される様子も確認された。これらの細胞は他の細胞よりも剛性が高い可能性があるため、測定する必要がある。そのためには、細胞がスリット内に侵入しやすい形状を考える必要がある。そこで、図 4-x に示すようにスリットの上流側にテーパをつける方法を考える。細胞の形状は球状であると考えられることができるため、テーパの角度がなだらかなるほど、スリットに進入しやすくなる。今後、多くの細胞を測定するためには、テーパの形状などについて検討を行う必要がある。

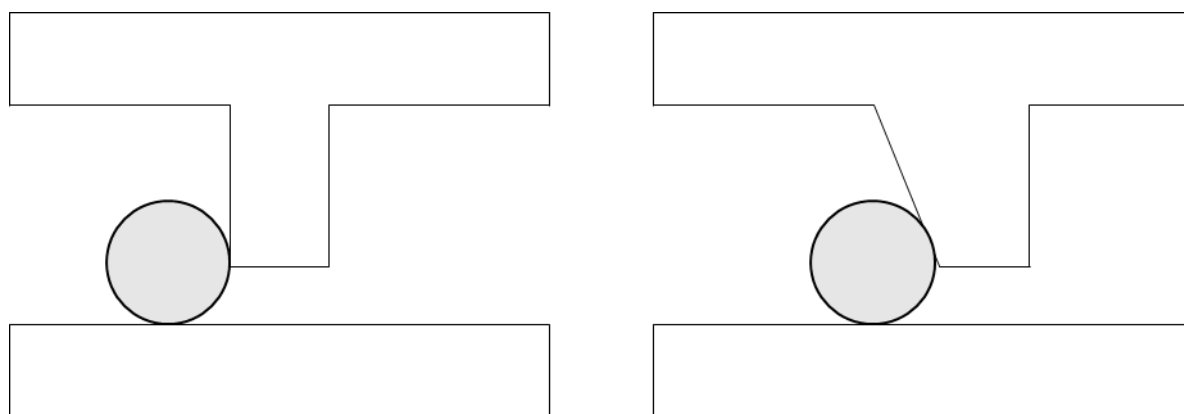


Fig. 4-12 スリット形状. 左：本研究で作製したスリット. 右：テーパ付きスリット.

他方、Lincoln らは良性乳房上皮細胞（MCF-7）と非転移性腫瘍乳房細胞（MCF-10）の変形能の差について検討している。その結果、MCF-10 は MCF-7 と比べて 5 倍伸展することが報告している<sup>[4]</sup>。また、Hou らは MCF-7 と MCF-10 の剛性の差について調査しており、MCF-10A は MCF-7 と比較して、剛性が高いと報告している<sup>[5]</sup>。すなわち、本研究で作製したスリットを改良すること

で、細胞の進入時間を計測することで、細胞分離システムへ応用が考えられる。

上記にも示したとおり、4 章で作製したマイクロ流路デバイスはスリット内の細胞の速度とスリットへ進入する時間の 2 種類の方法で、細胞分離システムへ応用が考えられる。今後、4 章で作製したデバイスを細胞分離システムへ応用するためには、いくつか改良する必要のある点が存在する。初めに、スリット外の細胞の速度を一定に保つために、入口出口の圧力差を一定にする必要がある。これは、シリンジポンプに圧力計などの数値をフィードバックし、動作を制御することで解決できると考えられる。

続いて、目的の細胞を振り分ける機構を追加する必要がある。これは、フローサイトメータのように細胞に荷電を行う方法が考えられる。しかし、このシステムを利用すると、マイクロデバイスの低コストといったメリットが損なわれてしまう。そのため、他の方法で振り分ける方法を検討する必要がある。そこで、電場を用いた方法を用いることを考える。電場内に粒子などを配置すると、プラスまたはマイナス方向へ移動する現象が見られる。この方法はたんぱく質などの解析に使用されており、電気泳動と呼ばれる。しかし、細胞のような中性粒子は均一電場では移動することはない。そこで、不均一電場を用いた誘電泳動と呼ばれる方法を用いる。誘電泳動とは、不均一電場内に中性粒子を配置すると、粒子内の電荷が分極を起こし、プラスまたはマイナス方向へ移動する現象である（図 4-13）。我々は、誘電泳動を用いて細胞を移動させる技術を報告している<sup>[9]</sup>。図 4-14 に示すように、マイクロスリットの下流側に電極を配置する。通常、細胞は①方向へ流動していくが、電極に通電することで、細胞は②方向のみへ移動する。つまり、マイクロスリットへの進入時間またはマイクロスリット内の移動速度を測定し、しきい値を超えた場合に電極に通電することで、①と②で物理的性質の差を持つ細胞試料を得ることができる。電極位置や回収側の流路形状については、詳細に検討する必要があるが、将来的には染色フリーの細胞分離システムへ応用することが可能であると考えられる。

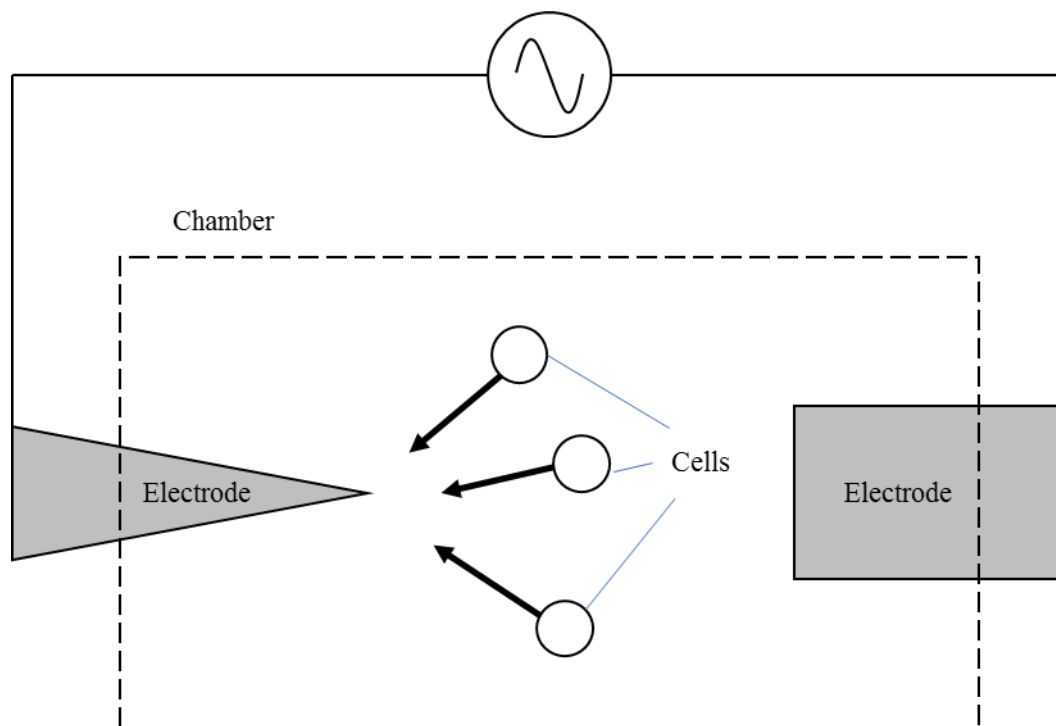


Fig. 4-13 誘電泳動の概要

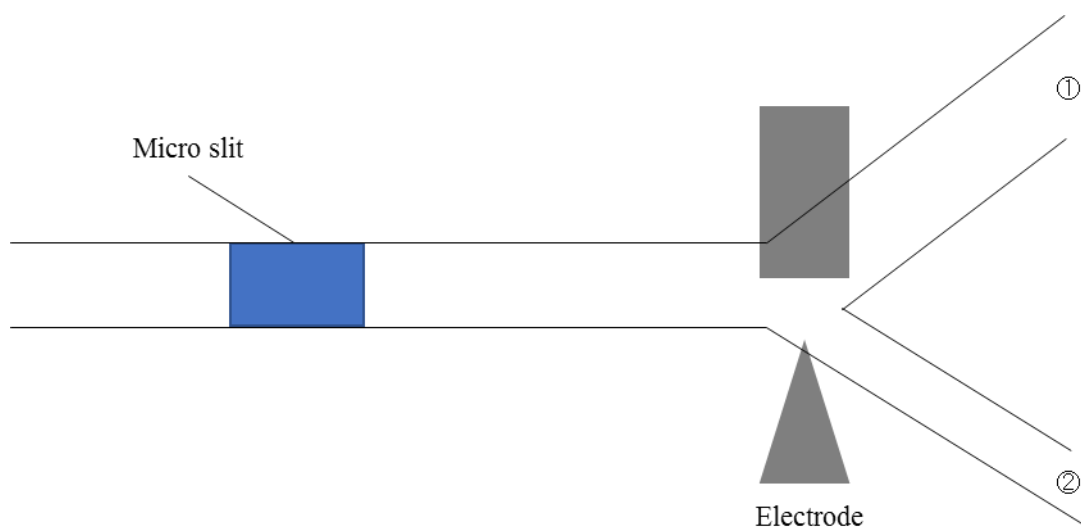


Fig. 4-14 細胞回収システムの概要.

#### 4-4-2. 細胞分離システムの提案

2 章, 3 章, 4 章で得られた結果から以下の図に示す細胞分離デバイスを提案する. 図 4-15 は全体像である. 流路は十字形状になっており, それぞれの端に入口と出口を作製する. 主流側には入口と出口をそれぞれ 1 つずつ作製し, 流路中央付近の上流側に  $20\ \mu\text{m}$ , 下流側に  $10\ \mu\text{m}$  の円柱スリットを設置する. 続いて,  $20\ \mu\text{m}$ ,  $10\ \mu\text{m}$  の円柱スリットの壁面から副流を流すために, 主流方向に対して直角方向に流路を作成する. 分離した細胞を回収するために, 副流側の入口は 2 つ, 出口は 5 つとする. 副流側の主流路より下流側に 2 章で提案したマイクログループまたは 4 章で



提案したマイクロスリットを配置する．初めに，主流のみで円柱スリットによって細胞を大きさで分別する．円柱スリットによって  $10\text{ }\mu\text{m}$  から  $20\text{ }\mu\text{m}$  の細胞を得ることが出来る．マイクロスリットの詳細は図 4-16 に示す．

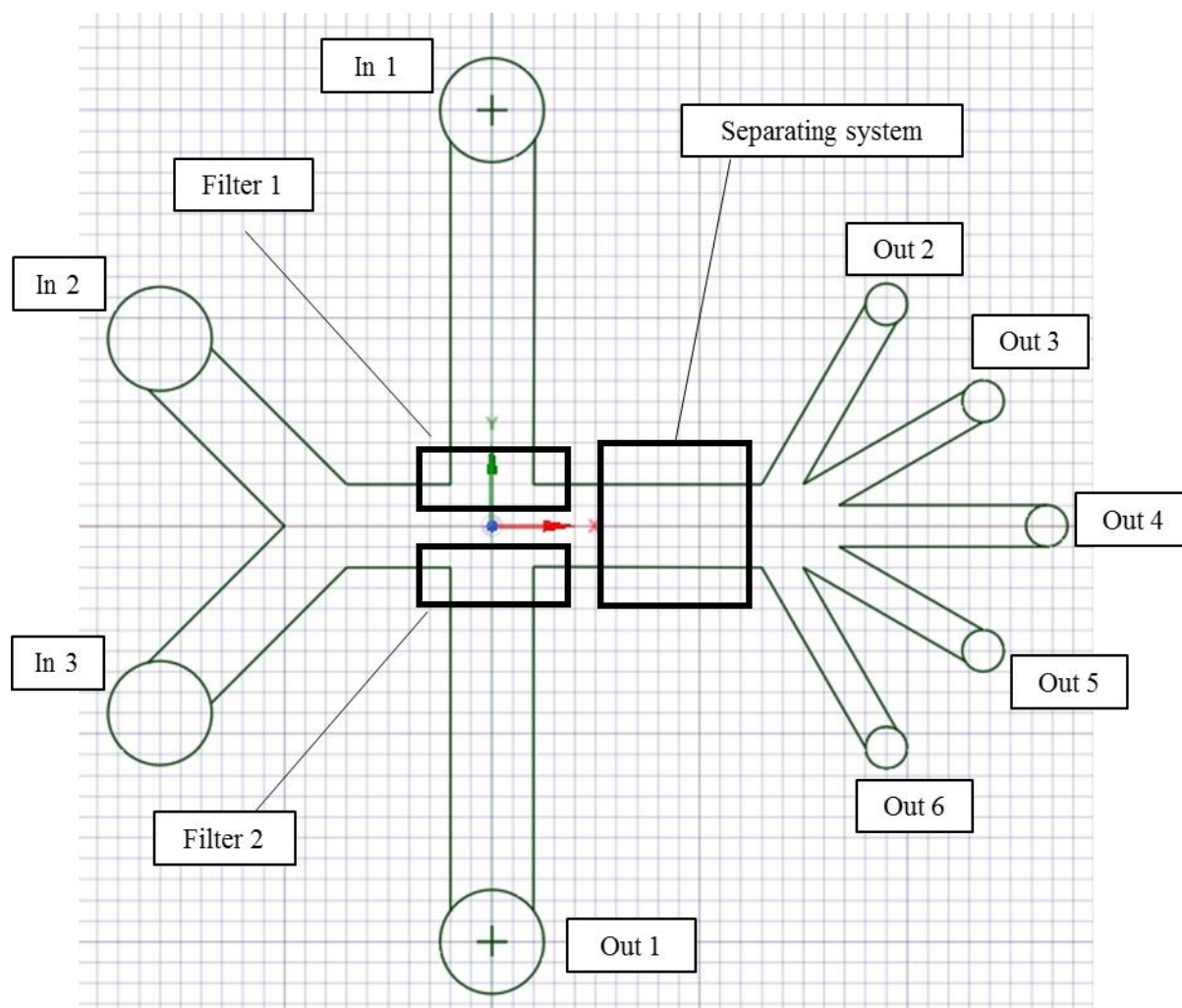


Fig. 4-15 細胞分離デバイスの全体像

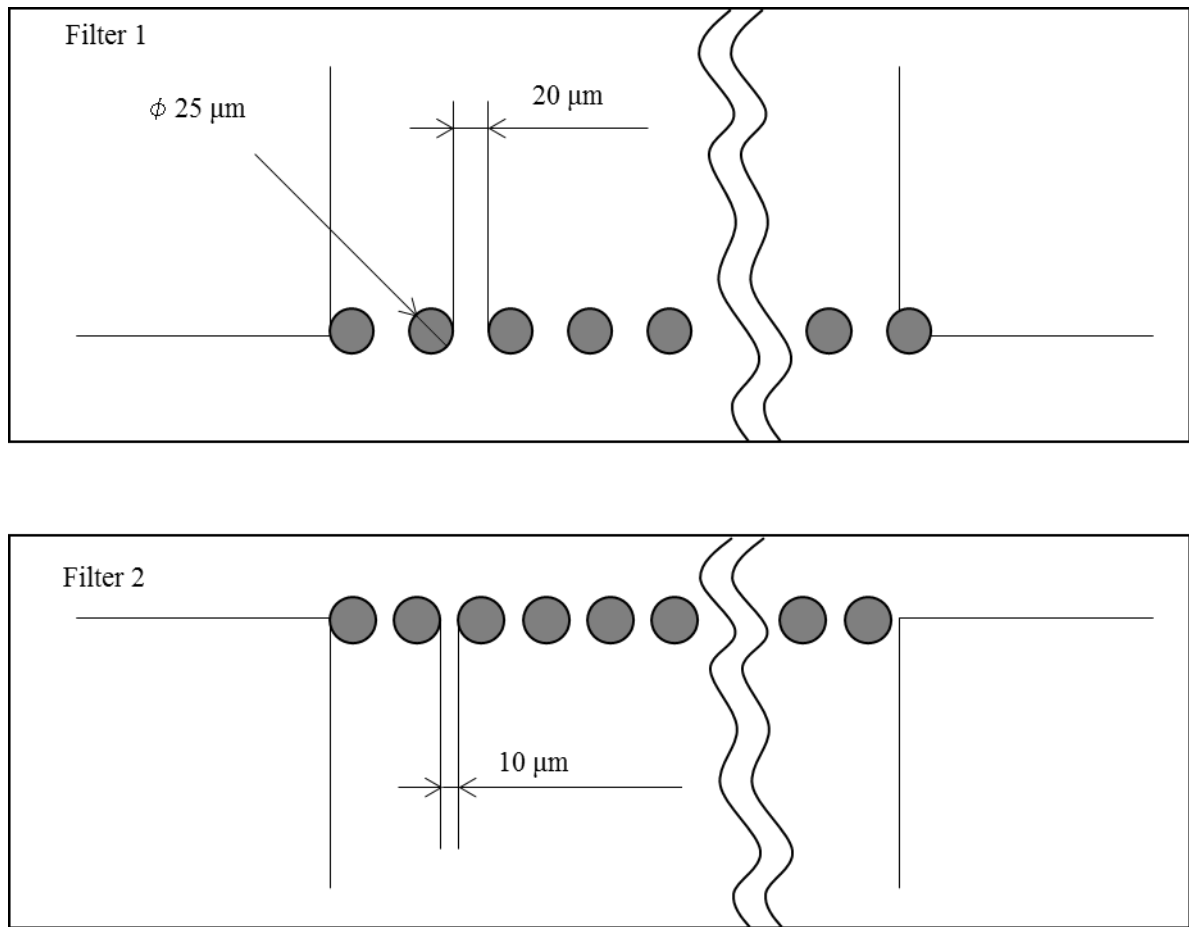


Fig. 4-16 フィルタ構造の概要図

続いて、円柱スリットに捕捉された細胞を回収するために、主流を止め、副流のみを流す。副流の下流側に図 4-17 に示すように、複数のマイクロ傾斜溝を配置する。細胞は 10 μm スリット側から流れていき、マイクロ傾斜溝によって副流と垂直方向に移動していく。この際、密度の高い細胞はより大きく移動するため、5 つある出口のうち、Out 1 番近傍に集まり、密度の低い細胞は Out 2 以下に集まるように条件を決定することで、細胞分離システムとして利用することが可能である。

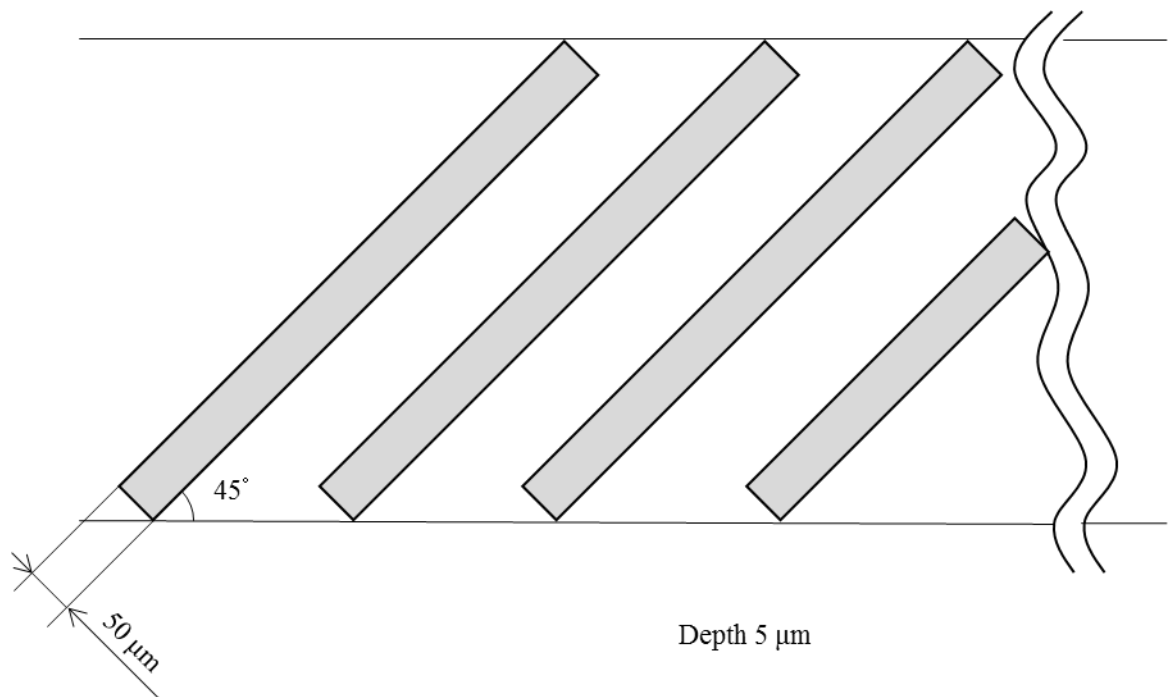


Fig. 4-17 マイクロ傾斜溝による細胞分離システムの概要

また、細胞分離システムにはマイクロ傾斜溝以外にも 4 章で作製したマイクロスリットを用いて分離することも考えられる。マイクロスリットの速度変化率を測定しやすいように、マイクロスリットの長さを 1mm とすることで、測定誤差が小さくなることが考えられる。

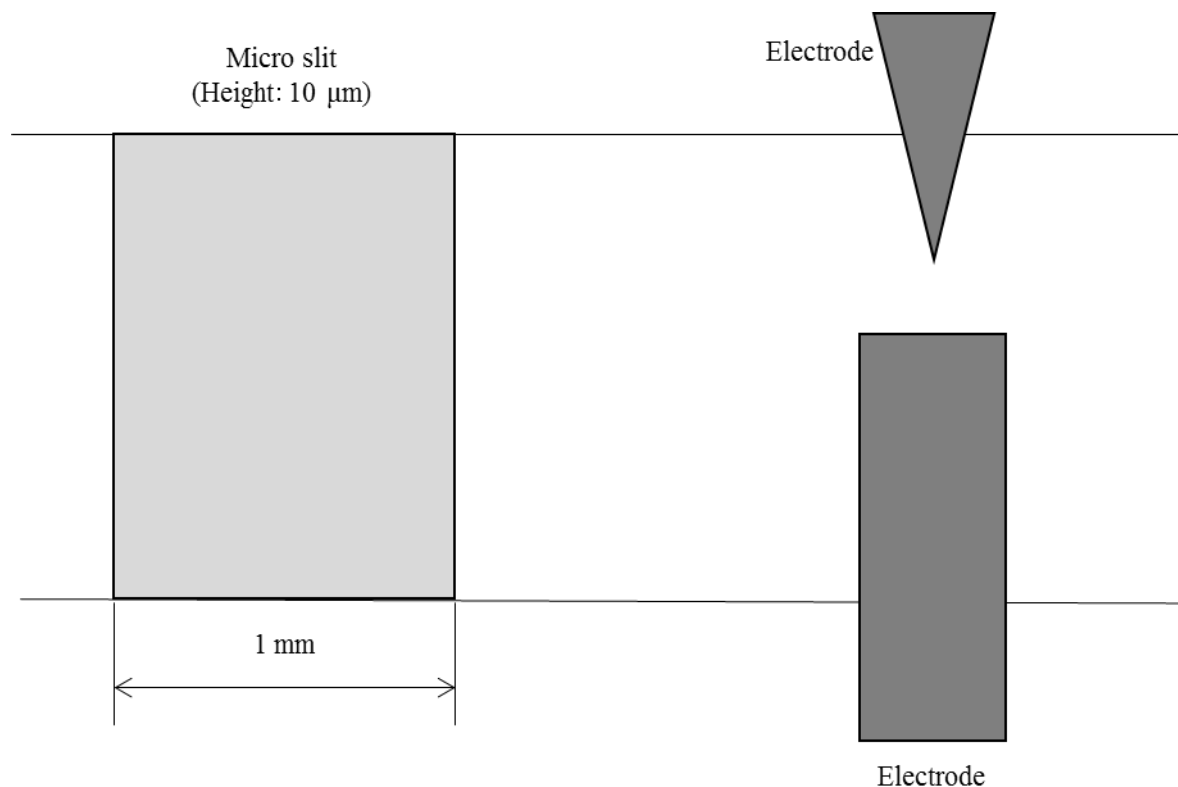


Fig. 4-18 マイクロスリットによる細胞分離システムの概要.

#### 4-5. 結言

細胞の変形率と速度比の関係を示すために、2種類のマイクロパターンを組み合わせた平行平板スリットを有する流路デバイスを作製した。作製した流路デバイスの評価として、スリット幅よりも小さな粒子であるブタ赤血球を使用し、スリット内外の速度比を測定したところ、10程度となり、理論値の13よりも低い値となった。マウス横紋筋由来筋芽細胞、マウス肝がん由来がん細胞、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞の3種類の細胞を用いて実験を行った。その結果、すべての細胞においてスリット内において、投影面積が増加し、速度が減少する傾向にあった。また、C2C12とHepa1-6は細胞の投影面積が大きいほど、速度比が上がる傾向にあった。一方で、Neuro2aは投影面積が大きいほど、速度比が下がる傾向にあった。

マイクロ傾斜溝、円柱スリット、マイクロスリットを組み合わせた細胞分離システムを考案した。それぞれの研究が進捗し、要素同士を組み合わせることで、細胞分離システムへの応用が期待できる。

#### 参考文献

- [1] Ren, Y., Huang, S.-H., Mosser, S., Heuschkel, M.O., Bertsch, A., Fraering, P.C., Chen, J.J., Renaud, P., A Simple and Reliable PDMS and SU-8 Irreversible Bonding Method and Its Application on a Microfluidic-MEA Device for Neuroscience Research, Vol. 6, No. 12 (2015), pp. 1923-1934.
- [2] Dunn, A.C., Zaveri, T.D., Keselowsky, B.G., Sawyer, W.G., Macroscopic friction coefficient

measurements on living endothelial cells, *Tribology Letters*, Vol. 27, No. 2, (2007), pp. 233-238.

- [3] Yokokura, T., Nakashima, Y., Yonemoto, Y., Hikichi, Y., Nakanishi, Y., Method for measuring Young's modulus of cells using a cell compression microdevice, *International Journal of Engineering Science*, Vol. 114, 1 (2017), pp. 41-48.
- [4] Lincoln, B., Erickson, H.M., Schinkinger, S., Wottawah, F., Mitchell, D., Ulvick, S., Bilby, C., Guck, J., Deformability-based flow cytometry, *Cytometry Part A*, Vol. 59, No. 2, (2004), pp. 203-209.
- [5] Hou, H. W., Li, Q. S., Lee, G. Y. H., Kumar, A. P., Ong, C. N. and Lim, C. T., Deformability study of breast cancer cells using microfluidics, *Biomedical Microdevices*, Vol. 11, No. 3 (2009), pp. 557-564.
- [6] Takahashi, Y., Hashimoto, S., Watanabe, M., Hasegawa, D., Dielectrophoretic movement of cell around surface electrodes in flow channel, *The Journal on Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol. 16, No. 3 (2018), pp. 81-87.

## 5 章 結論

本研究では、細胞の物理的性質を測定するために、マイクロ加工技術を駆使して 3 種類のマイクロ流路デバイスを作製した。そして、3 種類のデバイスを使用して、細胞実験を行うことで、以下の結果を得ることができた。

流れに対して  $45^\circ$  に向けたマイクロ傾斜溝を有するマイクロ流路デバイスを作成した。マイクロ傾斜溝の幅を 30, 40, 50  $\mu\text{m}$  とし、2 種類の細胞を用いて検討を行った。マイクロ傾斜溝上における細胞の流れに対して垂直方向の移動量は直径に依存することにはなかった。一方で、細胞の速度と垂直移動量には負の相関関係が得られた。細胞の速度が 300  $\mu\text{m/s}$  以下の時、40, 50  $\mu\text{m}$  の溝幅において、密度のより大きい Hepa1-6 において、C2C12 よりも垂直移動量が大きくなる傾向が認められた。

マイクロ円柱を複数配置したマイクロ流路デバイスを作成した。マイクロ円柱間距離を 10, 20, 30, 40  $\mu\text{m}$  とした。出入口の水頭差を利用して、小圧力環境 (30 Pa 以下) において 3 種類の細胞のスリット通過率を測定した。ブタ赤血球は直径が 6  $\mu\text{m}$  であるため、10  $\mu\text{m}$  のスリットを難なく通過する様子が確認できた。C2C12 と Hepa1-6 は 10  $\mu\text{m}$  のスリットに 100% 捕捉される様子が確認できた。また、20, 30  $\mu\text{m}$  のスリットにおいて、C2C12 の方が接着性などの影響により、Hepa1-6 よりも捕捉率が高くなる傾向が認められた。

マイクロ円柱スリットを利用して、がんの指標となる血中循環がん細胞を血液中から分離することを試みた。詳細な検討を行うために、マイクロスリット間距離を 10, 15, 20, 25  $\mu\text{m}$  とした。小圧力環境 (60 Pa 以下) において、実験を行った。肝がん細胞のスリット捕捉率を測定したところ、スリット幅が狭くなるにつれて捕捉率が上昇することを確認した。続いて、15  $\mu\text{m}$  と 20  $\mu\text{m}$  のスリットにおいて速度と細胞の捕捉率、通過率、接着率を測定したところ、細胞の速度が 600  $\mu\text{m/s}$  以下で細胞が基板に接着することを確認した。また、細胞の速度が上がると、細胞の捕捉率が上昇した。続いて、スリットに捕捉されている肝がん細胞の直径を測定したところ、20  $\mu\text{m}$  と 25  $\mu\text{m}$  では細胞の直径に有意な差は認められなかったが、スリットの幅が狭くなるにつれて、細胞の直径が小さくなった。最後に、ブタ赤血球と肝がん細胞を混合して、実験を行ったところ、肝がん細胞が捕捉されているスリットもブタ赤血球が通過する様子が確認できた。これらのことから、マイクロ円柱を有する流路デバイスはフィルタの機能を有しており、血液中からがん細胞を分離することができる可能性を見出した。

マイクロ加工を駆使して上下基板にマイクロパターンを作成し、2 枚の基板を組み合わせ高さがおよそ 10  $\mu\text{m}$  の平行平板スリットを有するマイクロ流路デバイスを作成した。3 種類の細胞を実験に使用した。細胞の直径、速度をスリット内とスリット外で比較した。初めに、ブタ赤血球を用いてスリット内とスリット外の速度の相関関係を調べたところ、スリット内の速度はスリット外の速度の約 10 倍であった。スリット外の細胞の投影面積は C2C12, Hepa1-6, Neuro2a それぞれ、424  $\mu\text{m}^2$ , 431  $\mu\text{m}^2$ , 436  $\mu\text{m}^2$  であり、細胞種類において差は見られなかった。続いて、スリット内とスリット外の投影面積の比を算出したところ、C2C12, Hepa1-6, Neuro2a それぞれ 1.15,

1.11, 1.15 となり、差は見られなかった。スリット外の細胞の速度は C2C12, Hepa1-6, Neuro2a それぞれ、68  $\mu\text{m/s}$ , 240  $\mu\text{m/s}$ , 43  $\mu\text{m/s}$  であった。すべての細胞において、スリット外の速度とスリット内の速度の比は、赤血球の場合の 10 倍よりも低く 3 倍であり、摩擦等の影響と考えられた。そして、C2C12, Hepa1-6, Neuro2a において、スリット外の細胞投影面積と速度比に相関関係は認められなかった。

本研究で得られた成果を表 5-1 にまとめる。密度で分離を目指した傾斜溝では、Hepa1-6 と MC3T3-E1 の分離の可能性が示せた。直径によって分離を目指した円柱スリットでは大きさの近い Hepa1-6 と C2C12 では分離の精度に問題があるが、大きさの異なる Hepa1-6 とブタ赤血球の分離は可能であった。細胞の変形性によって分離を目指したスリットでは、Hepa1-6, C2C12, Neuro2a 現段階では分離は困難であった。しかし、さらなる研究が行われることで、分離できる可能性があると考えられる。

Table 5-1 本研究で得られた結果のまとめ。

○：分離可能。△：分離精度に問題あり。？：現段階では分離困難

	傾斜溝（密度）	フィルタ（直径）	スリット（変形性）
① Hepa1-6	MC3T3-E1 : ○	C2C12 : △ sRBC : ○	MC3T3-E1 : ? Neuro2a : ?
② MC3T3-E1	Hepa1-6 : ○		
③ C2C12		Hepa1-6 : △	Hepa1-6 : ? Neuro2a : ?
④ sRBCs		Hepa1-6 : ○	
⑤ Neuro2a			Hepa1-6 : ? C2C12 : ?