

氏名	高橋優輔
学位の種類	博士(工学)
学位記番号	博甲第151号
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位授与年月日	平成31年3月31日
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 副査 鈴木健司 伊藤慎一郎 今村保忠 藤江裕道

論文要旨

本論文は、生体医工学：細胞のバイオメカニクスの研究分野において、マイクロ加工を利用して新たに微小流路デバイスを設計・製作し、*in vitro*において細胞浮遊液を流す試験を実施して、細胞の変形・移動を観察した成果をまとめたもので、以下の5章で構成されている。

1章 緒論

本章では、本研究の背景として、細胞の移動・変形挙動の*in vivo*での役割、医療診断・再生医療などの分野における標的細胞の検出や分別・収集の意義に関して論じている。

多細胞からなる個体は、様々に分化した細胞によって構成されている。細胞の種類毎に、また同じ種類でも細胞毎にその特性には差異がある。その差異は、個体内での、細胞の挙動を左右する。*In vivo*においては、その差異によって、特定の細胞を検出したり、分別したりしている。他方、これらの差異は、*in vitro*においても、標的細胞の検出や分別・収集に用いられる。例えば、医療診断においては、血液中の「がん細胞」などの特定細胞の検出方法が研究されている。また、再生医療においては、細胞の分別・同種細胞の選別収集などへ応用するための技術が研究されている。従来、各細胞の特性としては、膜たんぱく質の化学的な特性が利用されることが多い。これに対して、本論文では、各細胞の移動や変形の様子を取り上げた。

他方、近年、半導体分野におけるフォトリソグラフィ技術などのマイクロ加工技術が発達し、表面にマイクロメートルオーダーの形状模様を設けることが可能となってきている。細胞に適用する固体の表面設計としては、膜タンパクの化学的性質に対応して、表面化学的な観点

での研究が多い。本研究では、液中に浮遊する細胞等(直径 $8\ \mu\text{m}\sim 30\ \mu\text{m}$)を対象として、標的細胞の検出や分別・収集に適したマイクロメートルオーダーの凹凸形状を固体表面に設けた流路を探索した。試行錯誤を通じて新たに設計・製作した流路における細胞の移動・変形挙動を観察し、標的細胞の検出や分別・収集への応用について考察した。

2章 マイクロ傾斜溝における細胞の移動挙動

本章では、平行平板間に設けた間隔 $0.1\ \text{mm}$ 、幅 $1\ \text{mm}$ の流路の底面にフォトリソグラフィ技術などを用いて、浮遊細胞を捕捉するための凹みを設けた。すなわち、ガラス基板上にマイクロパターンを描いたものを型として、ポリジメチルシロキサン(PDMS)製の平板の上に凹みを設けて、流路を作製した。試験に供する細胞として、マウス肝がん由来がん細胞(Hepa1-6)を選択した。また、比較のために、マウス頭蓋骨由来骨芽細胞(MC3T3-E1)を選択した。数種の形状・寸法の凹形状を設計・製作して、水頭差による $100\ \text{Pa}$ 以内の入口・出口間圧力差によって、細胞の浮遊液を流した試験を実施した。その結果、特に、浮遊細胞の直径の半分以下の深さ($5\ \mu\text{m}$)の直方体形状溝(幅 $40\ \mu\text{m}$ 、長さ $0.2\ \text{mm}$)を、その長軸が主流に対して 45 度傾いた方向(マイクロ傾斜溝)に設けた場合に、細胞が凹みに沿って移動方向をシフトさせながら流される様子が観察された。そのシフトの距離は、細胞の速度が $0.3\ \text{mm/s}$ 以下のとき、MC3T3-E1の方がHepa1-6より小さかった。この場合、浮遊細胞の平均直径に関しては、MC3T3-E1では $16.2\ \mu\text{m}$ 、Hepa1-6では $15.4\ \mu\text{m}$ と、両群に有意差は認められなかった。このことから、マイクロ傾斜溝による細胞の分別への応用の可能性が示された。その移動方向シフト距離に関して、密度差などによる細胞の分別の可能性について考察している。

3章 円柱間スリットにおける細胞の変形・通過挙動

本章では、平行平板間に設けた間隔50 μm 、幅1 mmの流路の途中に、フォトリソグラフィ技術を用いて、浮遊細胞を捕捉するための複数のスリットを、並立するマイクロ直立円柱（直径25 μm 、高さ50 μm ）の間のスリット（長方形流路断面）として設けた。一定高さ50 μm のもとで数種のスリット幅（10 μm ～40 μm ）のものを製作した。試験に供する細胞として、Hepal-6を選択した。また、比較のために、マウス横紋筋由来筋芽細胞（C2C12）およびブタ赤血球を選択した。酸素プラズマアッシングによって、流路壁面を親水化した。その後、水頭差による30 Pa以内の入口・出口間圧力差によって、細胞の浮遊液を流した試験を実施した。ブタ赤血球は、幅10 μm のスリットを通過した。他方、Hepal-6およびC2C12は幅10 μm のスリットを通過できなかった。また、幅20 μm のスリットにおいては、C2C12とHepal-6との間で、通過率に差が見られた。この場合、浮遊細胞の平均直径に関しては、C2C12では23.0 μm 、Hepal-6では23.3 μm と、両群に有意差は認められなかった。浮遊細胞の直径よりもやや小さい20 μm の間隔のスリットを適用した場合、スリットの通過は細胞の大きさと変形性に関連することを考察している。また、スリット幅を25 μm 、20 μm 、15 μm 、10 μm と段階的に狭くしていった円柱列に対して、Hepal-6浮遊液を順番に通過させた場合、各幅のスリットに捕捉される細胞の直径の平均値から、円柱列が細胞の大きさによる分別フィルタとしての機能を果たすことがわかった。

4章 平行平板間スリットにおける細胞の変形・通過挙動

本章では、平行平板間に設けた間隔50 μm 、幅2 mmの流路の途中に、フォトリソグラフィ技術によって流路壁面上部と下部に各々直方体形状のマイクロ凸構造を製作し、両者の組み合わせによって浮遊細胞を捕捉するための通過距離0.1 mm幅0.8 mmの平板間スリットとした。試験に供する細胞として、Hepal-6を選択した。また、比較のために、C2C12、マウス神経芽細胞（Neuro2a）およびブタ赤血球を選択した。酸素プラズマアッシングによって、流路壁面を親水化し、さらに、4%ウシ血清由来アルブミン水溶液を注入し30分間静置することで、細胞の流路壁面への接着を抑制した。水頭差による

50 Pa以内の入口・出口間圧力差によって、細胞の浮遊液を流した試験を実施した。ブタ赤血球のスリット通過前とスリット通過中の速度との比が10倍であったことから、連続の式より、スリットの高さを13 μm と推定した。スリットを通過する細胞と通過しない細胞について、顕微鏡観察における画像においてスリット通過前後における各細胞の変形に伴う投影面積の変化・移動速度の変化を計測・比較した。すべての細胞において、スリット中で投影面積が増加していることから、スリット中で変形しながら通過していることがわかった。また、スリット通過中の細胞の移動速度は、通過前の移動速度の3倍程度であり、赤血球よりも遅いことから、周囲の流体よりも遅い速度でスリット中を移動していることがわかった。本スリットが、細胞を変形させた状態で通過挙動を観察するのに適していることがわかり、各細胞の変形性との関係を考察している。

5章 結論

本論文では、マイクロ加工技術を適用して、平行平板間流路において、各種の表面マイクロ凹凸構造を設けて溝やスリットを設計・製作し、各種細胞およびブタ赤血球（直径8 μm ～30 μm ）の浮遊液を通過させる試験を繰り返す試行錯誤を経て、数種のデバイスにおいて、浮遊細胞の密度・大きさ・変形性に関連した各細胞の変形・移動特性を検出するのに適した形状・寸法を見出した。2章では、浮遊細胞の直径の半分以下の深さ（5 μm ）の直方体形状溝（幅40 μm 、長さ0.2 mm）を、その長軸が主流に対して45度傾いた方向（マイクロ傾斜溝）に設けた場合に、細胞が凹みに沿って移動方向をシフトさせながら流されることを利用している。3章では、並立する直立マイクロ円柱の間に、浮遊細胞の直径よりもやや小さい幅15 μm ～20 μm の高さ50 μm の長方形断面の隙間のスリットを設けることによるフィルタ効果を利用している。4章では、高さ13 μm 、幅0.8 mm、通過距離0.1 mmの平行平板間スリットにおける細胞の変形・通過挙動を利用している。

本研究の成果は、細胞操作への応用として、標的細胞の検出や分別・収集手法の開発につながり、医療診断・再生医療などの分野への貢献が期待される。

論文審査要旨

機械工学専攻博士課程の高橋優輔氏より申請のあった学位請求論文「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」に対し、2019年1月23日（水）16：30～18：00に八王子校舎第5会議室において、主査橋本成広、副査鈴木健司、伊藤慎一郎、今村保忠、藤江裕道（首都大学東京）出席のもと、公開発表会を開催した。高橋優輔氏より、口頭での発表があり、その後、質疑を行った。

本論文は、生体医工学（細胞のバイオメカニクス）の研究分野において、マイクロ加工を利用して、細胞の分別への応用を指向した新たな微小流路デバイスを設計・製作し、*in vitro*において細胞浮遊液を流す試験を実施して、細胞の変形・移動挙動を観察した成果をまとめたものである。多細胞からなる個体は、様々に分化した細胞によって構成されている。細胞の種類毎に、また同じ種類でも細胞毎にその特性には差異がある。その差異は、個体内での、細胞の挙動を左右する。*In vivo*においては、その差異によって、特定の細胞が検出されたり、分別されたりして、生命活動が営まれている。他方、これらの差異は、*in vitro*においても、標的細胞の検出や分別・収集に用いられる。例えば、医療診断においては、血液中の「がん細胞」などの特定細胞の検出方法が研究されている。また、再生医療においては、細胞の分別・同種細胞の選別収集などへ応用するための技術が研究されている。従来、各細胞の特性としては、膜タンパク質の化学的な特性が利用されることが多い。これに対して、本論文では、各細胞の移動や変形の様子が取り上げられている。他方、近年、半導体分野におけるフォトリソグラフィ技術などのマイクロ加工技術が発達し、表面にマイクロメートルオーダーの形状模様を設けることが可能となってきた。細胞に適用する固体の表面設計としては、表面化学的な観点での研究が多い。本研究では、細胞自体の密度・変形性などの物理的な性質に着目している。すなわち、液中に浮遊する細胞等（直径6 μm ～30 μm ）を対象として、標的細胞の検出や分別・収集に適したマイクロメートルオーダーの凹凸形状を固体表面に設けた流路製作を探求している。試行錯誤を通じて新たに設計・製作した流路における細胞の移動・変形挙動

を観察し、標的細胞の検出や分別・収集への応用について考察している。

本文は、以下の5章で構成されている。1章「緒論」では、本研究の背景として、細胞の移動・変形挙動の*in vivo*での役割、医療診断・再生医療などの分野における標的細胞の検出や分別・収集の意義に関して論じている。2章「マイクロ傾斜溝における細胞の移動挙動」では、浮遊細胞の直径の半分以下の深さ（5 μm ）の直方体形状溝（幅40 μm 、長さ0.2 mm）を、その長軸が主流に対して45度傾いた方向（マイクロ傾斜溝）に設けた場合に、細胞が凹みに沿って移動方向をシフトさせながら流されることを利用している。3章「円柱間スリットにおける細胞の変形・通過挙動」では、並立する直立マイクロ円柱の間に、浮遊細胞の直径よりもやや小さい幅15 μm ～20 μm の高さ50 μm の長方形断面のスリットを設けることによるフィルタ効果を利用している。4章「平行平板間スリットにおける細胞の変形・通過挙動」では、高さ13 μm ・幅0.8 mm・通過距離0.1 mmの平行平板間スリットにおける細胞の変形・通過挙動を利用している。5章「結論」では、以上の研究によって得られた結論をまとめている。

以上、本論文では、細胞の種類に応じた密度・大きさ・変形性などの性質を利用して、流路底面の溝、円柱間隙、平板間スリットなどの形状を選択設計することによって、細胞の挙動を制御できることを*in vitro*における評価実験を通じて見出している。本研究の成果は、細胞操作への応用として、癌細胞などの標的細胞の検出や、各種細胞の分別・収集手法の開発につながり、医療診断・再生医療などの分野への貢献が期待される。

本論文は、今後の細胞のメカニクス分野の研究に大きな影響を与えるものである。公開発表会では、本論文の内容について明瞭な説明がなされ、副査からの質問にも丁寧に答え、概ね満足する回答が得られた。申請者は本論文審査用の審査付論文4篇を筆頭著者として発表し、本論文審査用以外の審査付論文3篇を筆頭著者として発表し、12篇の査読付き国際会議プロシーディングスを筆頭著者として発表し、1篇の査読付き国内会議プロシーディングスを筆頭著者として発表し、また、海外での国際会議での口頭発表を経験している。以上、論文内容と研究業績を鑑み、本審査を合格とする。