

《様式B》

研究テーマ	「ノズルアレイと多点光照射の融合による超並列単一細胞アセンブリの実現」		
研究責任者	所属機関名	国立大学法人	豊橋技術科学大学
	官職又は役職	講師	
	氏名	永井 萌土	メールアドレス nagai@me.tut.ac.jp
共同研究者	所属機関名		
	官職又は役職		
	氏名		

(平成 29 年度募集) 第 30 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要(1,000字程度)

実施内容と成果

- (1) ノズルアレイと多点光照射の融合による超並列単一細胞アセンブリの実現に向けて、液滴生成デバイスを PDMS で作製し、光硬化性液滴を生成することに成功し、液滴内に細胞を封入させた。液滴径、液滴生成周波数、細胞封入率について調査を行った。その結果、液滴生成周波数は 0min から 10min までの間は液滴生成が不安定な状態であり、10min 後以降は液滴生成の定常化が進み、そして、30min 後には定常状態になることを確認した。
- (2) Ficoll の濃度が高い液は時間経過後に細胞封入率は高く、低い液は時間経過後に細胞封入率は低くなった。これは Ficoll を加えることにより、光硬化性ゲル内の密度が増え、浮力を増加させて、細胞の沈殿を抑制したと考えられる。
- (3) 光硬化性ゲルを用いて、9 個配置された光照射パターンを用いた光硬化により、ゲル内に細胞が封入した。作製されたゲルは設計値の約二倍であった。硬化パターン以外の硬化も見られた。それぞれのゲルの大きさにもばらつきが見られた。積算光量が必要以上に高く、照射光が硬化パターンを均一に照らしていない可能性が示された。
- (4) 蛍光観察による細胞生存率の評価より、積算光量の増加に伴い、死細胞が増加した。本実験においては積算光量が $3.2 \times 10^4 \text{mJ/cm}^2$ を超えると細胞への毒性が高くなった。また光重合開始剤である LAP 濃度が細胞生存率に影響した。細胞生存率を高めるには積算光量を下げる、LAP 濃度を調整するといった手法が挙げられる。
- (5) 光硬化によるゲルの硬化具合の調査より、光硬化実験で示唆された、必要以上に高い積算光量及び照射光が硬化パターンを均一に照らしていない可能性が明らかとなった。
- (6) 上記(5)の課題点に対して、ビームエキスパンダを用いて解決を図る。ビーム径を拡大することで硬化パターンを均一に照らす。同時に、エネルギー密度が拡散することにより積算光量を下げることができる。

今後予想される効果

本研究で実現するアセンブリ技術は、単一細胞プリンタという新製品の誕生につながり、新市場・産業の創出が期待される。細胞プリンタの活用先として、先進国における医薬品メーカー、病院、研究所が考えられる。ノズルアレイ、多点光照射は、単体でも大量のバイオサンプルを扱うのに向いており、それぞれのバイオサンプル輸送、光刺激への応用も見込まれる。メカトロニクス技術に強い東海地域企業と共同研究を行い、実用化と産業振興を図っていく。

「健康長寿社会」の実現が期待されており、その実現には疾患（悪性腫瘍や生活習慣病）と治療メカニズムの解明が欠かせない。生命の最小単位「細胞」の機能を効率的に解明するのに、本研究の技術を使った生体外で再構築した細胞実験が有効活用できる。細胞プリンタを利用することで、ライフ・イノベーションを達成し、健康長寿社会の実現も可能とする。

2. 実施内容および成果の説明(A4で、5ページ以内)

① 緒言 研究目的

本研究では、ノズルアレイと多点光照射を融合して、超並列単一細胞アセンブリを実現することを目的とした。この実現を可能とするシステムの構成図を図 1 に示す。本研究は、機械工学やマイクロシステム工学を基礎とし、健康医療面に役立つ知見の獲得を下支えし、ライフ・イノベーションを推進する研究である。

従来の生体外での細胞配置技術は、質（単一細胞間の相互作用の再現）と量の両立が困難な問題があった。申請者は、細胞配置技術を質・量が両立したものに变革し、細胞機能と疾病原因を解明する。具体的な内容は、 10^2 の単一細胞（直径 $10\ \mu\text{m}$ 程度）を超並列（逐次処理の部分が少なく、並列化の度合いが高いこと）かつ μm の精度で空間的に再配置する超並列単一細胞アセンブリの実現である。本技術で細胞集団を生体外で再構築し、より本質的な細胞機能の計測、疾患の原因解明が可能となる。

本技術確立のために、ゲル内に固定する細胞の生存率を高めることにした。可視紫色レーザー、DMD（Digital Micro-mirror Device）、光硬化性ゲルを用いた細胞回収技術を利用する。硬化条件を変化させて、それぞれ形成されたゲル内の細胞の生存率を計測した。さらに液滴への細胞の封入について、長時間細胞を安定して封入できる方法の調査を行った。ヒト細胞である HeLa 細胞を流路に流し込み、液滴が生成される流入口で観察を行い、細胞の封入率を調査した。

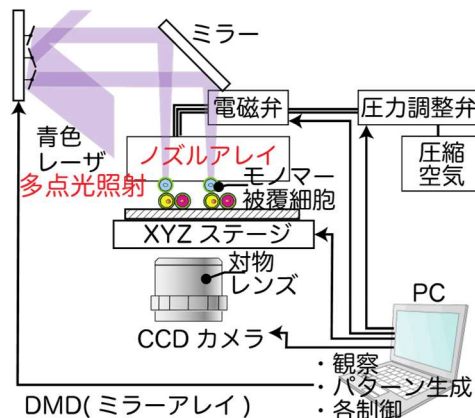


図 1 細胞アセンブリ技術を実現するシステム構成図

②光硬化の実験方法

本実験では HeLa 細胞（直径 $15\sim 20\ \mu\text{m}$ ）を使用した。硬化性モノマーの作製には PEG-DA[Poly(ethylene glycol) diacrylate average Mn700]を $0.3\text{g}(0.268[\text{mL}]$), PBS (pH7.4)を PEG-DA 含めて $3.00[\text{mL}]$, LAP(Lithium Phenyl (2,4,6-trimethy-benzoyl) phosphinate)を 0.0027g 用いた。

DMD を使用した光学系を用いて細胞の光硬化を行った。1辺が $48.6\ \mu\text{m}$ の正方形、間隔も $48.6\ \mu\text{m}$ とした 3×3 で配置した硬化パターンを使用した。照射強度は約 $2.0\times 10^4\ \text{mW}/\text{cm}^2$ で光照射を行い照射時間を $1.0\sim 2.0[\text{s}]$ まで $0.2[\text{s}]$ 刻みで変化させることで積算光量の異なるゲルを作製した。

光硬化させたゲルに -Cellstain-Calcein-AM solution を $2\ \mu\text{mol}/\text{L}$ となるように、PI stock solution を 4

$\mu\text{mol/L}$ となるように PBS で希釈した希釈液を加えた。15 分のインキュベートの後、蛍光観察を行いゲル内に封入された細胞の生存率を評価した。

③細胞の液滴内封入の実験方法

PDMS 流路はフォトレジスト SU8-3050 で型を作製した。透過性に優れるシリコンゴム PDMS(Polydimethylsiloxane)で型取りして PDMS 流路形状を得た。PDMS を塗布したガラス基板とプラズマ接合して、流路を作製した。

液滴が生成される分散相に細胞用の緩衝液には、PBS、光硬化性ゲルのモノマー PEG-DA Mn700、細胞沈殿防止に Ficoll PM400, HeLa 細胞を用いた。連続相には、Mineral oil, 界面活性剤の Span80 を用いた。これらをシリンジポンプ(New Era, NE-1000X)で流路に流した。液滴が生成される中央の流入口を倒立顕微鏡(Nikon, Eclipse Ti-U)と高速度カメラ(DIRECT, HAS-D71)で撮影した。撮影した動画から液滴生成周波数(1 秒間あたりに生成される液滴数)、細胞封入率(液滴内に細胞が 1 個以上封入される確率)を算出した。

④細胞の液滴内封入の実験結果と考察

作製した PDMS 流路を図 3 に示す。左側は分散相を流す流路、右側は連続相を流す流路である。分散相と連続相から流入した液は中央の十字路で合流し、液滴が生成された。このとき、長時間液滴内に細胞が安定して封入されることが望ましい。

液滴生成周波数は液の流入直後は約 50~130 Hz とばらつきが見られ、30 分経過すると、約 120~130 Hz で安定した。細胞濃度は $1.45 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ に調整し実験を行った。

図 4 に Ficoll の濃度を変更したときの時間経過に伴う細胞封入率の変化を示す。細胞封入率は、流入直後が最も高く、時間が経過するほど低下した。液の流入から 5 分経過したとき、Ficoll の濃度が高い液(10%, 7%)は 15%程度の封入率を保っているのに対して、低い液(4%, 0%)は 5%程度まで低下した。これより、Ficoll の濃度が高い液ほど時間が経過しても細胞封入率が安定することを示す。

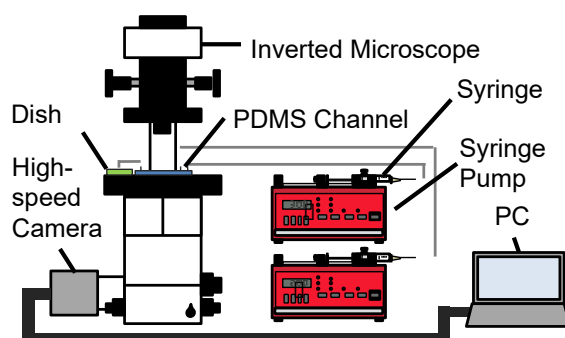


図 2 倒立顕微鏡と高速度カメラによる観察系

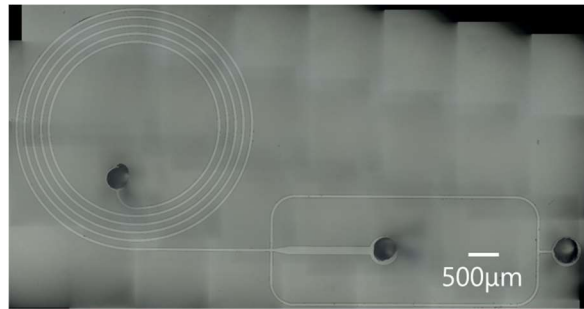


図 3 液滴生成用の PDMS 流路作製結果

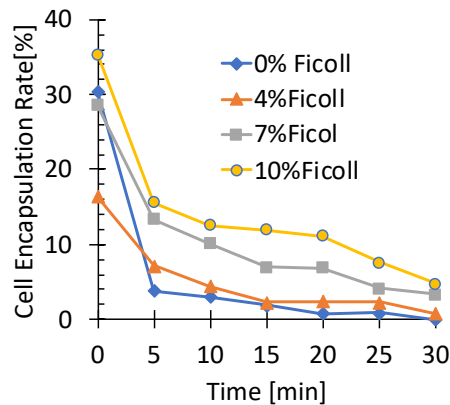


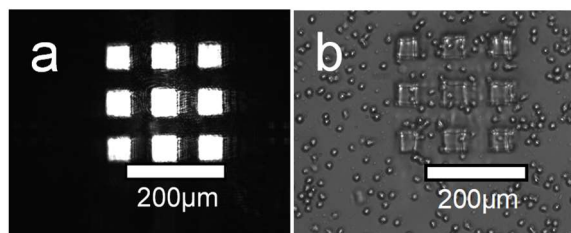
図 4 Ficoll の濃度の違いによる時間経過に伴う細胞封入率の変化

⑤光硬化の実験結果と考察

硬化パターンを用いて、光硬化させることで、細胞をゲル内に封入することに成功した。図 5 に使用した硬化パターン及び、細胞の観察結果を示す。このとき(b)の積算光量は $2.1 \times 10^4 \text{mJ/cm}^2$ で硬化させたものである。同様に(c), (d)も同じ積算光量にて行った蛍光観察結果である。細胞の生存率を評価するにあたって、細胞の封入数を上げるために、硬化パターンの寸法を大きくし、また細胞濃度を上げた。

光硬化させた後に生細胞及び死細胞を染色し、生存率を求めた。照射時間ごとに、封入された細胞数と生存率を図 6 に示す。2.1 から $2.9 \times 10^4 \text{mJ/cm}^2$ までは生存率が 60~70%までを保っているが、 $2.9 \times 10^4 \text{mJ/cm}^2$ を境に生存率は半減している。これにより本実験では積算光量が約 $3.0 \times 10^4 \text{mJ/cm}^2$ を超えると、光硬化の際、細胞への毒性が高くなると考えられる。

積算光量の増加に伴い、生存率が低下するのは、ゲル内の光重合開始剤である LAP に光照射した際に発生するラジカルが原因だと考えられる。積算光量と LAP 濃度の最適化により、生存率を保つことができる。



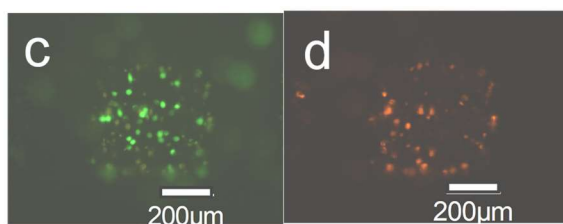


図 5 ゲル内への細胞封入. (a)使用した硬化パターン (b)実際の光硬化, (c)生細胞, (d)死細胞.

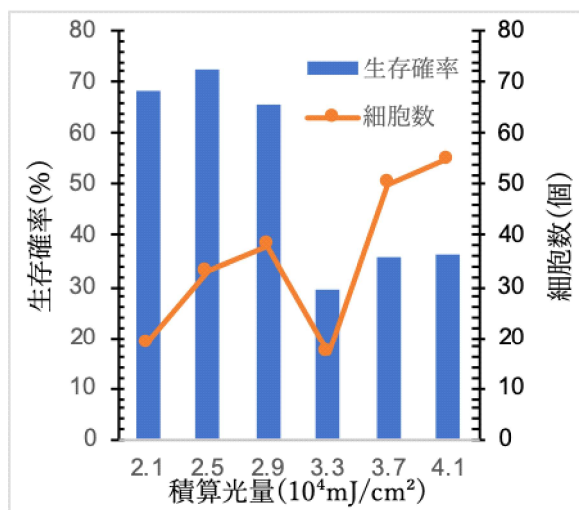


図 6 ゲル内に封入した細胞数と生存率

⑥結言

PDMS 流路を用いて液滴の生成に成功した. Ficoll の濃度を変更し, 時間経過に伴う細胞の封入率の変化を観察した. 今後は細胞濃度の増減による細胞封入率の変化を計測し, 細胞封入液滴を回収し, 光照射による光硬化性液滴の硬化を確認する. さらに光硬化による細胞封入後の生存率を評価した. 積算光量が $3.0 \times 10^4 \text{mJ/cm}^2$ 未満の時, 生存率が 60%以上となった. 今後の課題は, 細胞の生存率の上昇と 3D アセンブリに活用し, 10^2 の単一細胞を超並列かつ μm の精度で空間的に再配置する超並列単一細胞アセンブリの実現を目指す.

謝辞

本研究の遂行にあたり, 一般財団法人 東海産業技術振興財団にご援助して頂きましたことを感謝いたします. また研究遂行にあたっては, 小林隼大氏, 福永健氏の協力を得ました.