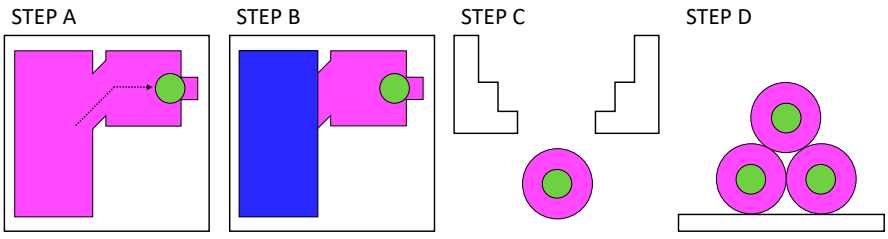
199　オルガノイドアレイ構築用の超並列細胞プリンタの開発	永井　萌土

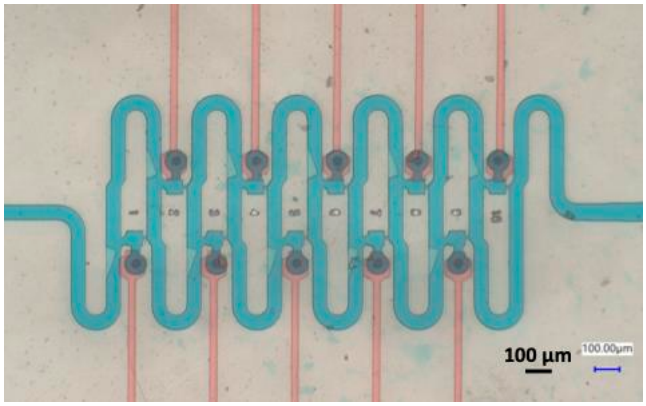
【目的】健康長寿社会に向けて、慢性疾患の解明と治療が望まれる。ヒトによる疾患の解明と薬効試験は困難さがあるため、*in vitro* にて疾患を模擬した組織・臓器モデルが代替手段となる。例えば細胞スフェロイドにより腫瘍研究、抗がん剤探索がなされる。ただし生体外でのスフェロイドは、細胞種も限定的で単一細胞間の相互作用の再現が欠けていることから、*in vivo* での現象の再現性には懐疑的な見方がある。そこで本研究の最終目的は、直径約 10 μm の 10^4 の単一細胞を対象にして、超並列かつ μm の精度で空間的に再配置し、オルガノイド（*in vitro* での 3 次元臓器）アレイの構築につながる超並列細胞プリンタを開発することである。本研究では、細胞配置のスループットを異なる次元に増大させるために、単一ノズルの計測制御を取り除く。つまり流体力学的な自動配置をベースにし、ノズルアレイへの流体抵抗を低くして、単一細胞を配置する。加えて光硬化性樹脂での細胞の被覆、ノズルからの外部への吐出も実現する。

【方法】超並列細胞プリンタの主要素は、細胞吐出を行うノズルアレイである。特にエポキシ系フォトレジスト SU-8 とシリコーンゴムである PDMS を組み合わせ、単一細胞への光硬化性樹脂の被覆機能を統合したノズルアレイの作製を行った。ここでは空圧流路も組み込むことで、細胞の捕獲と吐出を切り替えられるバルブも設けた。この作製したノズルアレイを利用して、単一の細胞や粒子の捕獲、被覆、吐出特性を評価した。

【結果】細胞用流路、PDMS 可変膜、空圧用流路を組み合わせた多層構造を達成した。開口部と捕獲部を隣接して設計することで、被覆された単一細胞の輸送距離を約 20 mm から約 110 μm へと大幅に短縮した。PDMS 可変膜と空圧用流路により 0.25 s 以下での PDMS 可変膜の開閉を実現した。HeLa 細胞と同等の大きさのトレーサ粒子を導入し、単一粒子の捕獲を達成した。被覆時の非活性流体として Mineral Oil に 1 v／v% Span80 で混合した溶液を導入し、単一粒子の被覆を達成した。吐出の際は液滴が粒子より先行し、続いて単一粒子が吐出された。HeLa 細胞を導入すると、その集団の一部がノズルアレイのチャンバに引き込まれ、捕獲された。ただし、すべての細胞が捕獲されたわけではないため、その理由を検証した。バイパス流路を通過する HeLa 細胞に比べ、チャンバに流入する粒子の方がサイズが大きいことから、十分な割合の細胞が捕獲されないことを見出した。

単一細胞プリンティングの原理図と作製した単一細胞吐出用ノズルアレイの顕微鏡像





199. オルガノイドアレイ構築用の超並列細胞プリンタの開発

永井　萌土

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科 機械工学系

Key words : マイクロノズルアレイ，空圧バルブ，細胞プリンタ，光硬化性樹脂，単一細胞操作

緒　言

健康長寿社会に向けて、慢性疾患の解明と治療が望まれる。ヒトによる疾患の解明と薬効試験は困難さがあるため、*in vitro* にて疾患を模擬した組織・臓器モデルが代替手段となる。例えば細胞スフェロイドにより腫瘍研究、抗がん剤探索がなされる。一方でこのような生体外でのスフェロイドは、細胞種も限定的で単一細胞間の相互作用の再現が欠けていることから、*in vivo* での現象が現れているのかに懐疑的な見方がある。

この不具合を克服するために、単一細胞レベルで、*in vitro* で細胞を基板上に再構築することもできる。例えば単一細胞を確実にノズルから吐出配置するインクジェット法が用いられる［1］。我々も単一のピペットを使ってのマイクロウェル内へのヒト単一細胞を配置している［2］。ところが確実な配置の代償として、単一ノズルの計測制御が欠かせなくなり、配置量の増加に伴って計測制御コストが増大してしまう。細胞配置のスループットを異なる次元に増大させるために、単一ノズルの計測制御を取り除く必要性がある。

この問題点の解決策として、流れを用いた自動的配置［3, 4］を行うことにした。申請者の提案手法では、流体力学的な自動配置をベースにし、ノズルアレイへの流体抵抗を低くして、単一細胞の配置を実現する。本研究の最終目的は、この自動配置機能を取り込み、直径約 10 μm の 10^4の単一細胞を対象にして、超並列かつ μm の精度で空間的に再配置し、オルガノイド（*in vitro* での 3 次元臓器）アレイの構築につながる超並列細胞プリンタを開発することである。期間内では、単一細胞の被覆と吐出の両方の機能を有するノズルアレイの設計、作製、評価を行った。このノズルアレイの流路は、空圧を印加することで変形する可変膜を有し、状態を切り替えるバルブとして機能する。ノズルアレイの評価結果として、粒子および細胞の捕獲、被覆、吐出の評価を報告する。

方　法

1.　統合ノズルアレイの構造と動作原理

統合ノズルアレイは多層構造であり、Ⅰ）空圧用流路、Ⅱ）可変膜、Ⅲ）細胞用流路、で構成される。観察を容易にするため、材料を使用した。空圧用流路と可変膜は透明なポリジメチルシロキサン（PDMS）、細胞用流路は、厚膜フォトレジスト SU-8 を使用した。図 1a では、可変膜を閉じた状態で、光硬化性ゲルを含む溶液中の細胞を導入する。オーバーハング構造と流量差により、細胞がチャンバで捕獲される。図 1b では、非活性流体を導入し、細胞を光硬化性ゲルで被覆する。図 1c、d では、可変膜を開き、開口部から吐出する。開口部はチャンバに隣接して配置した。被覆された単一細胞の通過を可能とするため、直径を 35 μm とした。

2.　統合ノズルアレイの作製方法

Ⅰ）空圧用流路の型は、SU-8 を Si 基板上に塗布し、スピンコートして形成した。積算光量 2,500 mJ/cm^{2}で露光し、酢酸 2-メトキシ-1-メチルエチルに 10 min 現像した。この型に対し、主剤と硬化剤を重量比 10：1 で混合した PDMS を流し込み、80℃で 40 min ベークして、転写した。Ⅱ）可変膜は、未硬化の PDMS を Si 基板上に滴下・スピンコートし製膜した。80℃、45 min ベークした。Ⅲ）細胞用流路は開口部、オーバーハング構造、チャンバを 3 段に分割し、作製した。Si 基板上に SU-8 を塗布し、スピンコートして製膜した。積算光量 2,500 mJ/cm^{2}で露光し、酢酸 2-メトキシ-1-メチルエチルに 10 min 現像した。

各層を結合するために、PDMS に対して大気プラズマ処理を行い、Ⅰ）空圧用流路とⅡ）可変膜を 80℃で 15 min ベークして接合した。PDMS 側に窒素プラズマ処理を行い、Ⅰ）空圧用流路とⅡ）可変膜、Ⅲ）細胞用流路を 120℃で 15 min ベークして接合した。

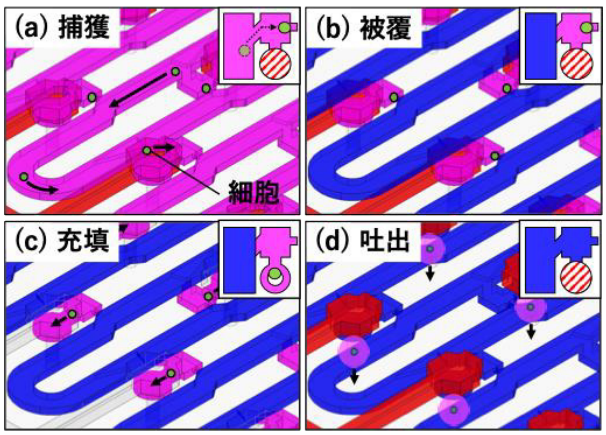


図 1. 統合ノズルアレイを用いた細胞アセンブリの 4 工程

(a)　捕獲工程：単一細胞が各チャンバに捕獲される。

(b)　被覆工程：細胞が光硬化性ゲルで被覆される。

(c)　充填工程：可変膜を開けると同時に被覆した細胞をノズル開口部に移動する。

(d)　吐出工程：被覆した単一細胞を続けてノズル外へ吐出する。

3.　粒子の捕獲、被覆、吐出実験方法

作製した統合ノズルアレイにテスト細胞の大きさと同等である直径 20.0 μm のトレーサ粒子を導入し、捕獲、被覆、吐出の実証を行った。粒子は純水で希釈した 7 w／v% Ficoll PM400 溶液に懸濁した。空圧用流路に純水を注入後、200 kPa の空圧を印加して可変膜を閉じた。細胞用流路の導入口から粒子懸濁液を 0.2 μL/min で導入した。チャンバでの捕獲を確認後、被覆を行った。被覆時の非活性流体として、Mineral Oil に 1 v／v% Span80 で混合した液を 0.2 μL/min で導入した。被覆後、空圧用流路の空圧を除荷し、可変膜を開き、粒子の吐出を行った。倒立顕微鏡と高速度カメラを使用し、撮影速度 500 fps、シャッタースピード 1／10,000 s で撮影した。

4.　テスト細胞の導入方法

作製した統合ノズルアレイにテスト細胞として HeLa 細胞を導入し、流入圧力を変化したときの細胞用流路内の流れを評価した。細胞は 10 w／v% PEG-DA、7 w／v% Ficoll PM400、PBS 溶液に懸濁した。空圧用流路に純水を注入後、200 kPa の空圧を印加して可変膜を閉じた。細胞用流路の導入口から細胞懸濁液を 3、6、9、12 kPa で導入した。倒立顕微鏡と高速度カメラを使用し、撮影速度 500 fps、シャッタースピード 1／20,000 s で撮影した。撮影後、バイパス流路を通過する HeLa 細胞に着目し、チャンバ入口から細胞までの距離を測定した。

結果および考察

1. 統合ノズルアレイの作製結果

図 2a では、上部のⅠ）空圧用流路と下部のⅡ）可変膜が接合され、バルブとして機能できる。図 2b では、上部より、オーバーハング構造、チャンバ、開口部を確認した。これより、SU-8 による多段構造を達成した。図 2c では、Ⅲ）細胞用流路（青色）の直上にⅠ）空圧用流路（赤色）がアライメントされており、空圧用流路、可変膜、細胞用流路を組み合わせた多層構造を達成した。また、本デバイスは透明材料を使用していて、流路内の現象理解に有効である。

開口部直径は、29.9±1.7 μm（n=3）であった。テスト細胞の直径が 10 μm から 20 μm であり、開口部を通過可能である。チャンバ-開口部間の測定値は約 110 μm である。従来の距離が 20 mm に対して、2 桁は短縮している。これより、単一細胞の被覆と吐出効率の上昇を期待できる。

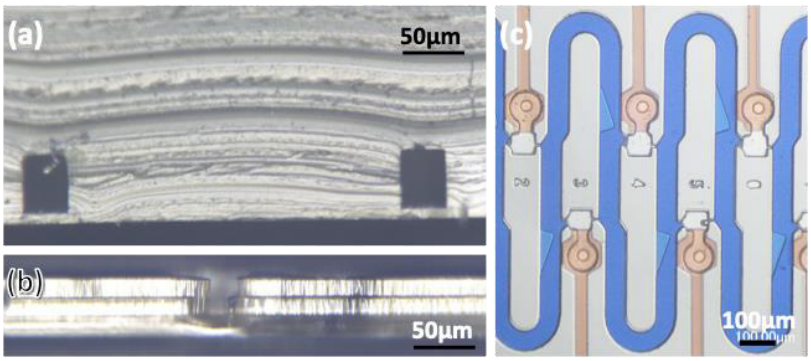


図 2. 作製した統合ノズルアレイ

(a) 空圧用流路ー可変膜断面。断面図において、下側に可変膜、真ん中に黒色の空圧用流路が見られる。

(b) 細胞用流路断面。この流路断面では、3 層の SU-8 流路構造が観察できる。

(c) 流路拡大図。赤色の空圧用流路が青色の細胞用流路の上に重ねてあり、多層構造が構築できている。

2. 粒子の捕獲、被覆、吐出実験結果

PDMS と SU-8 の透明材料を用いたことで流路内の観察が可能であり、現象理解に有効である。オーバーハング構造により単一粒子がチャンバに引き込まれ、捕獲された（図 3a)。非活性流体の導入により、チャンバ境界で界面が形成され、単一粒子の被覆を達成した（図 3b)。続けて単一粒子は被覆された懸濁液と分離し、吐出された（図 3c)。分離されてしまった理由は、粒子が捕獲部に強く吸着されたことが原因である。使用した 7w／v% Ficoll PM400 水溶液の粘度は、2.56 mPa・s である。一方で、光硬化性ゲルとして使用することを想定している 10 w／v% PEG-DA、 7 w／v% Ficoll PM400、PBS 溶液の粘度は、4.29 mPas である。このような粘度の違いもノズルアレイからの吐出の際の違いにつながると考えられる。

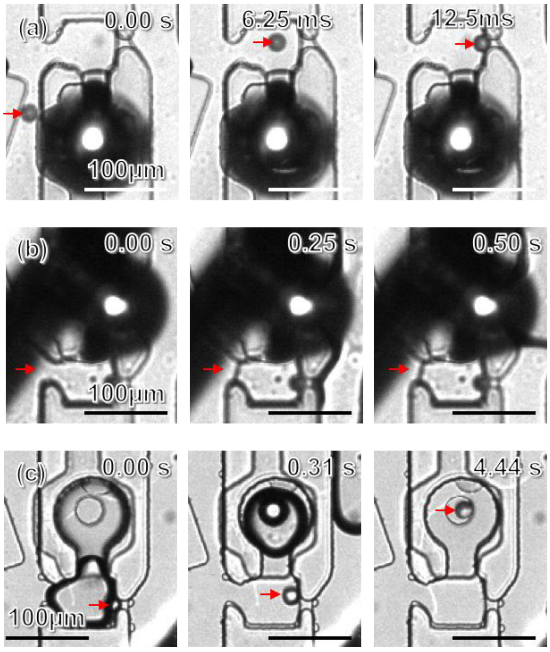


図 3. 粒子実証実験結果

(a) 単一粒子の捕獲。赤矢印は粒子を示す。単一粒子が捕獲部に捕捉された。

(b) 単一粒子の被覆。赤矢印は界面が形成される領域を示す。粒子が捕捉された状態でミネラルオイルを流したときに、光硬化性樹脂の溶液との界面が生じ、粒子が光硬化性樹脂で被覆された。

(c) 単一粒子の吐出。赤矢印は粒子を示し、光硬化性樹脂で被覆された粒子に対し、光硬化性樹脂の方が先に吐出される。その後に続いて粒子がノズルから吐出された。

3. テスト細胞のノズルアレイへの導入結果

HeLa 細胞を導入するとその集団の一部はチャンバに引き込まれ、捕獲された（図 4a）。ただし、すべての細胞が捕獲されたわけではないため、その理由を検証した。バイパス流路を通過する HeLa 細胞を計測すると、チャンバ入口ー細胞間の距離は、印加圧力に依存せずに一定であった（図 4b）。一方で、20.0 μm のトレーサ粒子がチャンバに流入するとき、チャンバ入口ー粒子間の距離は約 10.5 μm であった。これは捕獲されない細胞と入口間の距離よりも近い。粒子や細胞がチャンバに導入されるときは、オーバーハング構造が物体をチャンバ側に正常に押し出している。HeLa 細胞の場合は、大きさが一定ではないため、オーバーハング構造の高さを満たさない小径の細胞は、この上部を通過する。バイパス流路を通過する HeLa 細胞に比べ、チャンバに流入する粒子の方が大きいことから、十分な割合の細胞が捕獲されないと考えられる。

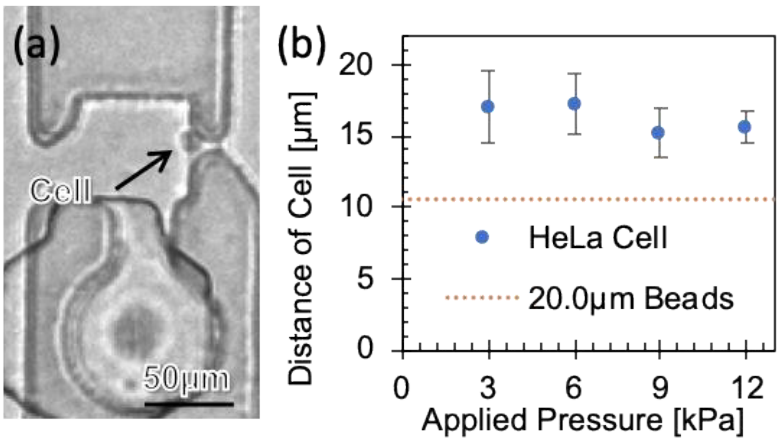


図 4. 単一細胞の捕獲特性の評価結果。
(a) 捕獲された単一細胞。
(b) 入口ー細胞間の距離と印加圧力の関係（n＝4）。

4. 結論

本研究では、単一細胞の被覆機能を統合したノズルアレイを作製し、特性評価を行った。空圧用流路、可変膜、細胞用流路を組み合わせた多層構造の作製を達成した。PDMS、SU-8 の透明材料を使用しているため、流体の輸送現象理解に有効である。トレーサ粒子を使用し、単一粒子の捕獲、被覆、吐出を達成した。最後に細胞を使った評価により、細胞を捕獲することに成功した。

共同研究者

本研究の共同研究者は、豊橋技術科学大学大学院工学研究科マイクロ・ナノ機械システム研究室の棚木健太郎氏、見富佳祐氏である。

文　献

1) Yusof A, Keegan H, Spillane CD, Sheils OM, Martin CM, O'Leary JJ, et al. Inkjet-like printing of single-cells. Lab Chip. 2011;11(14):2447-54. Epub 2011/06/10. doi: 10.1039/c1lc20176j. PubMed PMID: 21655638.
2) Nagai M, Kato K, Oohara K, Shibata T. Pick-and-Place Operation of Single Cell Using Optical and Electrical Measurements for Robust Manipulation. Micromachines. 2017;8(12). Epub 2018/11/08. doi: 10.3390/mi8120350. PubMed PMID: 30400543; PubMed Central PMCID: PMCPMC6187867.

3) Frimat JP, Becker M, Chiang YY, Marggraf U, Janasek D, Hengstler JG, et al. A microfluidic array with cellular valving for single cell co-culture. Lab on a Chip. 2011;11(2):231-7. PubMed PMID: WOS:000285514700006.
4) Sauzade M, Brouzes E. Deterministic trapping, encapsulation and retrieval of single-cells. Lab on a Chip. 2017;17(13):2186-92. PubMed PMID: WOS:000404469800003.