

# 超音波振動を用いたマイクロ流路デバイスにおける 細胞接着力の非接触測定

Cell adhesion measurement in microchannel device by ultrasonic vibration

2181013



研究代表者  
(助成金受領者)

東京工業大学 物質理工学院

助教 倉科 佑太

## [研究の目的]

近年、iPS細胞が樹立され、2014年には世界で初めてiPS細胞を用いた網膜の治療法が確立されるなど、国内外問わず培養細胞を用いた治療法が高い注目を集めている。このように、iPS細胞を用いた臓器復元の可能性が示されたことから様々な難治疾患に対する治療法が考案され、これらの治療に必要な細胞の大量培養のための自動培養技術や組織構築のための3Dプリンタ技術などの革新的な技術が生み出されている。新たな細胞や臓器が生み出されていく一方で、依然としてがんによる死因は国内で他の死亡原因に差をつけて一位であり、その根本的な治療法などについては未だに解決されていない。その要因のひとつにがん細胞の転移がある。本研究では、転移メカニズムに大きく関係する細胞接着の定量評価について評価することを研究の最終的な目的としている。

体内の細胞は、血球系の細胞を除いてその大部分が細胞同士で接着または、細胞外マトリックスに接着して存在している。このような細胞は接着していない場合には、生細胞でも増殖することができないことや、細胞が分化する際には接着形態が著しく変化することが知られている。すなわち、増殖や分化などの細胞特性は接着性と極めて密接に関係している。このため、細胞の接着力を測定することで、細胞の接着性と細胞特性の関係性について定量的にそのメカ

ニズムを解明できる。しかし、従来の接着性の測定方法は、原子間力顕微鏡のカンチレバーを用いて細胞にせん断応力を与える方法(図1A)や細い流路内で培地を流し、流水刺激を印加する方法(図1B)が用いられていた。しかし、これらの方法では、細胞が接着している仮足の一部に局所的な力がかかり、仮足が損傷することで細胞が剥離される。すなわち、細胞が剥離するのではなく、仮足の強度を測定して

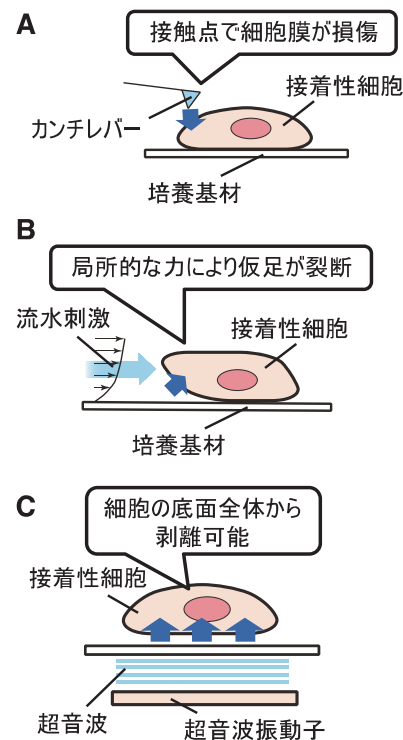


図1 従来の細胞接着力の測定方法(A:カンチレバー, B:流水刺激)およびC:提案する音圧による細胞剥離方法

いるに過ぎない。このため、細胞の接着力を測定するためには、底面から均一な力を付与する必要がある。一方で、我々はこれまでに超音波振動を培養基材に印加することで細胞を剥離する酵素フリーの剥離技術について研究している。以上の背景と研究技術を鑑み、本研究では、細胞の基材底面から超音波振動を照射して細胞を剥離して、細胞の接着力を測定することを最終的な目標とし、細胞を少数細胞単位で測定できるように、マイクロ流路内で細胞を配列させて、細胞を超音波振動で剥離できるデバイスの製作を行った。

## 【研究の内容, 成果】

### (1) 照射装置の製作

本研究では、培養基材底面に接着している細胞に対して、培養ディッシュ底面から超音波振動を透過させることによって細胞を剥離する装置を開発した。

本装置(図2)は、ドーナツ型の圧電素子をガラス製振動板に貼り付けることで振動子とし、シリコンカバーとフェルトではさみ、PLA製のカバーではさみこむことで加振器を製作した。次に、細胞を培養するマイクロ流路を製作した。マイクロ流路の製作にはPDMSのプラズマボンディングを用いた。なお、PDMSの鋳型をレーザー描画装置を用いて製作した。マイクロ流

路は流路幅  $150\ \mu\text{m}$ 、高さ  $100\ \mu\text{m}$ 、長さ  $15\ \text{mm}$  とした。はじめ、ボンディングする基材としてポリスチレン製の培養ディッシュを検討していたが、流路に送液できるだけのボンディングは困難であった。このため、基材をカバーガラスに変更し、ボンディングした。

製作した培養チャンバーを70%エタノールで消毒後、PBSにより洗浄した。その後、間葉系幹細胞 ( $2.0 \times 10^6/\text{mL}$ ) を播種し、12時間インキュベータ内で培養した。図3に示すように、流路内の細胞は12時間後には仮足を伸ばし、培養基材に接着していることがわかる。超音波加振器の上に設置するために、マイクロ流路設置用の治具を3Dプリンタを用いて製作した。製作した治具と加振器の間は超音波が伝達するようにグリセリンを満たした。

図4に示すように超音波加振器の上に12時間細胞を培養したマイクロ流路を設置した。シ

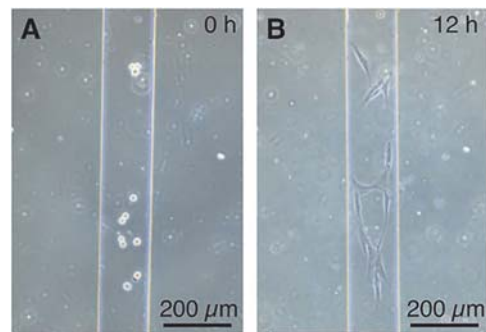


図3 マイクロ流路内での細胞の様子 (A: 播種直後の細胞, B: 培養12時間後の細胞)

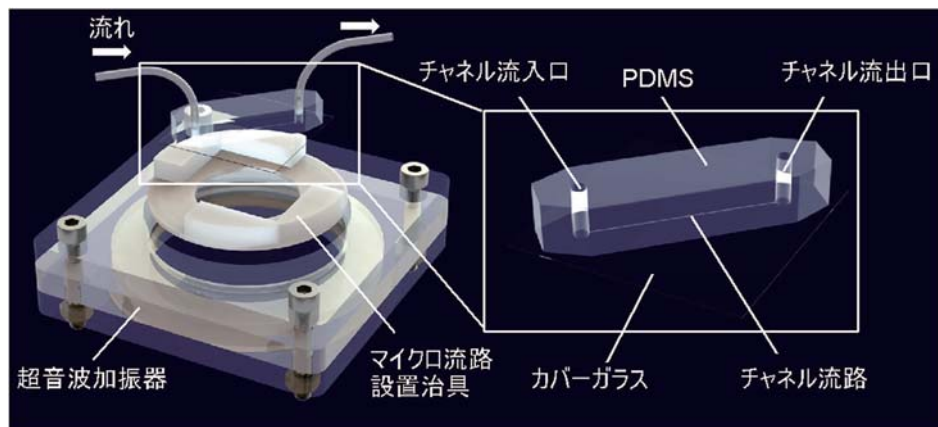


図2 超音波振動によるマイクロ流路細胞剥離装置



図4 シリンジポンプにより送液したマイクロ流路細胞剥離システム

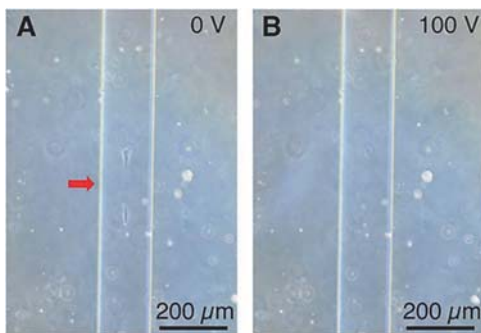


図5 超音波振動による細胞剥離 (A) 前 (B) 後の様子 (印加電圧 0 V, 100 V.)

リンジポンプを用いて PBS を  $0.2 \mu\text{L/s}$  で送液した。マイクロチャネルの反対側には廃液用のボトルを用意し、超音波振動を付与している間は常に送液するようにした。また、超音波加振器はアンプとファンクションジェネレータに接続し、交流電力を印加した。印加した交流周波数を 29–31 kHz とスイープさせることで、マイクロ流路ごとの個体差により、異なる共振点を有していた場合にも共振で振動するようにした。印加する電圧は 0 V から徐々に増加させていき、100 V 印加した際に、図 5 に示すように細胞が剥離する様子を確認した。

以上の結果から、マイクロ流路内の細胞に底面から超音波振動を印加することで、剥離できることが確認できた。しかし、細胞を剥離する際に、マイクロ流路の入り口付近に接着していた細胞が剥離したときに、測定しているマイクロ流路中心付近に存在する細胞と接触することで、剥離が誘発される様子も確認された。加えて、送液する際に空気のバブルが入り込むこと

でも細胞の剥離が誘発されてしまうことも確認した。これらのことから、剥離した細胞により測定する細胞の接着力を阻害することがないようにマイクロ流路の構造や送液条件を変更する必要がある。また、バブルが入り込まないように培養液を PBS に置換する際には、三方活栓など送液する溶液を切り替えることが必要であると考えられる。これらの改善を行うことで、本デバイスを使用した細胞接着力の測定が可能となると考えられる。

#### [今後の研究の方向, 課題]

装置についての改善点などは、上記したような点が考えられるが、本研究で細胞剥離システムが開発されたことで、細胞接着に関する様々な現象について言及することが可能になると考えられる。その一つとしてがん細胞の転移にともなう細胞の接着性の評価がある。これは、例えば細胞の周期 (分裂期と間期) の間での細胞接着性の違いや細胞種ごとの接着性の違いがある。細胞は一般的に分裂期にさしかかると細胞の形態が変化し、基材への細胞接着面積が大きく低減する。また、細胞種が異なることはがん化した部位による転移リスクについて検討することが可能になる。

加えて、細胞の接着力の特性の詳細も調べることが可能となる。例えば、細胞が剥離するために必要な力の半分の力を細胞に印加した後に、再度細胞を培養した場合に、その接着性はその

後は復元するのか、それとも維持されているのか。また、復元に要する時間はどれだけ必要かなどの接着特性についての詳細な議論を行うことができる。

以上のことを解決することができれば、従来、測定することが困難であった細胞の接着力という機械的特性を明らかにし、細胞の状態を定量的に測定することが可能となる。これにより、治療に用いる細胞の活性をラベリングせずに非接触で調べることや、がん細胞の転移メカニズムについての知見から新たな分子標的治療薬の創製が期待できる。

[成果の発表、論文等]

- [1] Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Kiichiro Totani, Kenjiro Takemura, "Cell patterning method on a clinically ubiquitous culture dish using acoustic pressure generated from resonance vibration of a disk-shaped ultrasonic transducer," **IEEE Trans Biomedical Engineering**, vol.66, no.1 pp.111-118, 2019.
- [2] Hanako Tauchi, Chikahiro Imashiro, Taiki Kuribara, Genichiro Fujii, Yuta Kurashina, Kiichiro Totani, Kenjiro Takemura, "Effective and intact cell detachment from a clinically ubiquitous culture flask by combining ultrasonic wave exposure and diluted trypsin," **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2019. [in press]
- [3] Chikahiro Imashiro, Makoto Hirano, Yuki Fukuma, Kiyoshi Ohnuma, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, "Cell sheet fabrication by Langevin piezoelectric transducer having homogeneous thickness vibration mode," EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, Hawaii, US, 2018/12/10-14.
- [4] 今城哉裕, 平野真, 福間優希, 大沼清, 倉科佑太, 竹村研治郎, 超音波振動による培養ディッシュからの細胞シート剥離, 第18回日本再生医療学会総会, 神戸国際会議場, 兵庫県, 2019/3/21-23