マイクロチップで細胞を健全に飼う

細胞を用いたマイクロチップ研究が注目されているが、マイクロチップ内の良好な細胞培養についての研究はほとんど行われていない。そこで、細胞培養条件に着目し、細胞へのストレスを低減して細胞の健全な培養を達成した。本稿では、マイクロチップ内細胞培養と培養した細胞を利用したマイクロ化学システムを紹介し、医療や産業への応用について述べる。

田 中 有 希
佐 藤 記 一
北 森 武 彦

1. はじめに

マイクロ化学チップ（以下マイクロチップと略す）とは、マイクロメートルオーダーの微細な流路を加工した数 cm 大の小型デバイスで、従来ビーカーやフラスコあるいは大型のケミカルリアクターや分離精製装置を用いて行われてきた化学反応プロセスをより高速高効率で実現することを目的として開発されている。このようなシステムは μ -TAS (Micro Total Analysis System) あるいは Lab-on-a-Chip、集積化化学実験室 (Integrated Chemistry Lab) などと称されるが、電子回路を半導体チップに集積化することによりコンピューターや情報社会が急速に発展したように、化学分野における技術的変革をもたらす可能性を秘めていると期待され、急速に注目を集めている^{1)~3)}。とくに近年、化学分析や分子生物学・生化学分析、医療診断分析、コンビナトリアルケミストリーなどさまざまな分野において、小型化、高密度化、高効率化、ハイスループット化あるいはモバイル化への要求はきわめて大きく、マイクロチップはこれらの要求に応えられるものとして大いに期待されている。

マイクロチップのマクロな系と異なるもっとも顕著な特徴はそのサイズ効果にある。すなわち、①ミクロな空間では、通常のマクロな系に比べて空間サイズが小さいために分子輸送・拡散距離がきわめて小さい、②液体の体積が小さいために体積に対する界面の面積（比界面積）が非常に

大きい、③マイクロチャネル中の流れは低レイノルズ数流れであるという特徴がある。この性質をうまく活かした実験系を設計することにより、効率的な化学プロセスを実現することが可能となる。また、小さいということから分析・反応などに必要な試料・試薬量、投入するエネルギー、生じる廃棄物量、実験スペースを大幅に削減することができる。これは今日のグリーンケミストリーなどの社会的要求を満たすものであり、これからの実験システムとしてふさわしいと言えるだろう。筆者らはこれまでにマイクロチップ（図 1 に一例を示す）と汎用的に使える独自の高感度検出器である熱レンズ顕微鏡を組合せることにより、マイクロ FIA システム^{4), 5)}、マイクロ溶媒抽出分析システム^{6)~8)}、化学反応の温度制御⁹⁾、イムノアッセイシステム^{10), 11)}、マイクロ細胞実験室¹²⁾、ナノ流体実験システム¹³⁾などを構築しており、化学分析だけでなく化学品の合成や生産など、基礎科学研究や化学工業技術の分野においても

図 1 マイクロチップの例

TANAKA, Yuki (左) 東京大学大学院工学研究科 (113-8656 東京都文京区本郷 7-3-1)・日本学術振興会特別研究員、博士(工学)。2004年 東京大学大学院工学系研究科博士課程修了。専門はマイクロチップ化学。

SATO, Kiyochi (中) 東京大学大学院農学生命科学研究科応用生命化学専攻 (113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1)・助手、博士(農学)。1999年 東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了。専門は生体成分の分析化学、酵素学。

KITAMORI, Takehiko (右) 東京大学大学院工学系研究科・教授、工学博士。1980年 東京大学教養学部基礎科学科卒業。専門は化学システムの集積化。単一分子分光、ナノ空間化学。

Stress-free Cell Culture inside Microchip

多くの利点や用途をもつことを示してきた。

一方、分子生物学や基礎研究から、診断などの医学分野や創薬などの応用研究まで、細胞を用いた研究は必須である。通常、培養細胞を用いた研究には、直径数 cm のシャーレや直径数 mm のウェルが並んだマイクロタイタープレートと呼ばれるポリスチレン製の容器が用いられている。しかしながら近年、単一細胞分析、コンビナトリアルケミストリーと組合せた多数の並列実験、実験のハイスループット化、などのニーズが高まっており、マイクロテクノロジーの導入により、より高感度で高速、高効率的な実験をより少数の細胞で実現することが期待されている。

このような考えのもと、細胞とマイクロチップを組合せたシステムの開発がいくつか進捗しつつある。しかしながら、その多くは、外部で培養した細胞を導入し、分離する(セルソーター)もの¹⁴⁾や内容物の分析を行う¹⁵⁾もの、もしくは、細胞をマイクロパターンニング上に並べるものにとどまっており、マイクロチップ内で細胞を培養して、アッセイなどに利用するということには至っていない。

マイクロチップを用いた細胞実験を実現するためには、単なるバルク実験系の小型化ではなく、総合的なマイクロテクノロジーによる解決が必要である。すなわち、培養から分析までの全過程に適したチップの設計・製作、チップ内部での養分や酸素の供給、細胞に悪影響を与えない送液、下流部における化学反応、温度制御、表面処理、分離、検出などの点を明らかにする必要がある。なかでももっとも重要な課題は、マイクロチップ内部というきわめて狭い閉鎖空間において、単に生命を維持するだけでなく、その本来の機能を維持した状態で長時間にわたって細胞を培養するための技術開発であり、これを実現することなしに細胞を用いたマイクロシステムの開発はありえない。そこで、本稿では、マイクロチップ内部での健全な細胞培養を実現するために必要な要素について示し、これらの条件の最適化について述べる。

2. マイクロチップ内細胞培養のための 基盤要素技術

具体的にマイクロシステム内で機能を維持した状態で細胞を培養する際に問題となると予想され、検討すべき点をあげると、閉じた微小空間であるため、培地の供給が必要であること、培地を供給するには精密な流体制御が必須であること、マイクロチャネルの表面を修飾する必要があること、熱容量が小さく、温度が変化しやすいため、精密に温度制御する必要があること、などである。本稿では、頁数の制限もあり、この中から、

- a. 培地の不足
- b. マイクロチャネルの表面状態

図2 マイクロチップ内での細胞培養
(a) 培地供給なし, (b) 培地供給あり

c. マイクロチャネル内の流れによるせん断応力について、それぞれの詳細と解決法について述べる。

a. 培地の供給

通常のシャーレやフラスコなどを使った細胞培養では4~5 mm 程度の厚さに培地をはり、その上は解放され空気と接触する形で培養する。細胞1個あたりの培地量は約10 nL 程度であり、これにより細胞は十分な栄養分と酸素を得て、さらに不要な老廃物が希釈されていくことにより生命を維持している。それに対して、マイクロチップ空間では、1細胞あたりの培地の量は約0.1 nL と約2桁減少し、さらに培養槽は閉じた空間であるため、栄養分や酸素の欠乏・老廃物の蓄積などが問題となると考えられる。実際、ガラスマイクロチップ内でラットの肝細胞を培養したところ、培養開始から2時間経過後ほとんどの細胞が死滅した。(図2(a))

この問題を解決するために必要なのがフローシステムである。すなわち、マイクロチップ空間はマイクロチャネルを血管とみなすと、微細流路からなる生体類似環境であるため、組織の細胞が血液の供給を受けるのと同様にマイクロチャネルを通じて新しい培地や酸素などを絶えず供給することによって、マイクロチャネル全体で長期間にわたって良好な細胞培養を実現できると期待できる。ラットの肝細胞を、培地フロー下で培養したところ、マイクロチップ内では従来2時間で死滅していた細胞が、培養開始から4日経過後でも、良好に生存していることを確認した(図2(b))。このように、マイクロチップ内の細胞培養においては、培地をフローシステムによって供給することが重要である。

b. 細胞培養表面の処理

多くの動物細胞は固体表面に接着することにより初めて増殖し、さまざまな活性を示すことが知られている。したがって細胞を培養して何らかの機能を維持させるために

は、マイクロチップ内部に細胞を接着させるための部位を形成させることが重要である。マクロな細胞培養の系でも、表面処理を施したポリスチレン表面に接着させて培養を行う。マイクロチップの素材として多く用いられるガラスやシリコン、PDMS 表面で培養を行う場合にも何らかの工夫が必要なことは明らかである。

とくに、マイクロチップのような微小空間内では比表面積が大きいので、流路表面が系全体に与える影響は大きく、表面の処理がキーポイントである。筆者らの研究室では、これまでにマイクロチャネル表面の処理によって、気液・液液（水相・有機相）多相流の形成¹⁶⁾や、マイクロチャネル表面への触媒担持、膜の形成¹⁷⁾などの成果を示してきた。さらに、処理方法も溶液を接触させて物理吸着させる方法のほか、ガラス表面のシラノール基に化学結合させる方法、表面でラジカル重合を起こさせる方法、表面張力を利用してマイクロチャネルの一部のみを修飾する方法など、マイクロチップ内でも使えるさまざまな表面修飾技術を開発してきた。

細胞培養のためのマイクロチャネル内の表面処理としては、細胞を接着させたい固相表面をコラーゲンやフィブロネクチンなどのタンパク質をはじめとする細胞外マトリックスでコーティングする方法が効果的であると考えられる。細胞の生育に影響を与えないために、処理方法は物理吸着を用いるのが最適であると考え、洗浄したガラス表面にこれらのタンパク質の水溶液を接触させることにより修飾した。筆者らの研究室では、これまでに神経細胞、肝細胞、上皮細胞などの初代培養を実現しているが、コーティングするタンパク質の種類や吸着させる時間などは培養したい細胞によって異なり、細胞に適していないものを用いた場合は、細胞の形態が変化するだけでなく、細胞の機能にも影響があることを確認した。肝細胞の培養を行う場合、表 1 に示すように、コラーゲンで表面を処理した場合は細胞がよく生着し、機能も高く維持できたが、ポリリジンやフィブロネクチンを用いた場合では、細胞は形態異常や機能低下を示した。すなわち、肝細胞をマイクロチップ内で培養する場合は、コラーゲンを用いて表面をコーティングすることが、細胞へのストレス低減に有効である。

c. せん断応力

マイクロチャネル中は、レイノルズ数が 10 未満の低レイノルズ数環境であり、流体が層流を形成して流れているため、壁面付近に生じたパラボリックな速度勾配によりせん断応力が生じる。マイクロチャネル底面に接着して生存している細胞に対して、せん断応力は、引きはがすような力を加えるだけでなく、流れそのものの力学的刺激が細胞に対してストレスとなると推測される。そこで、培地を流しながら細胞を培養する場合、このせん断応力がマイクロチャネル中の細胞に対して与える影響についても検討する

表 1 培養表面のコーティングの種類と肝細胞

物質	コラーゲン	ポリリジン	フィブロネクチン
細胞形態
	正常	伸展	伸展
1時間後の 接着率	80 %	50 %	70 %
アルブミン 合成	80	25	35
尿素合成	85	20	25

表 2 せん断応力が細胞に与える影響

剪断応力 (Pa)	~ 0.3 Pa 毛細血管内と同等	0.3 Pa ~ 2.5 Pa 静脈内と同等	2.5 Pa ~ 動脈内と同等
細胞形態
細胞増殖 (3日後)	240 %	150 %	90 %
アルブミン 合成	100~120	40~60	5

必要がある。そこで、マイクロ流体制御技術を駆使して供給する培地の流速や粘度を変化させ、せん断応力が肝細胞の増殖や形態、物質合成能に及ぼす影響について実験した。肝細胞に 0.02 Pa（毛細血管内と同等）から 6.0 Pa（動脈内と同等）のせん断応力を負荷して培養した結果、表 2 に示すように、せん断応力が上昇すると形態が伸展したりはがれたりするだけでなく、増殖率が低下したりタンパク質の生産が低下したりするなど、機能にも影響することも見いだした。

以上のように、マイクロチップ内での細胞培養には培地の供給が不可欠であるものの、細胞にストレスを与えない流速などの条件を制御・維持することが必要である。

3. マイクロチップ内培養細胞を利用したシステム

上記のように、マイクロチップの表面修飾や培養液の流れによるせん断応力が細胞へのストレスとなり、細胞の正常な形態や機能の喪失に至ることを見だし、それらの条件を検討して最適化した結果、肝細胞の機能を正常に維持したまま培養することに成功した。この細胞培養システムを用いて、がん細胞に対する抗がん剤の有効性を調べるアッセイを行った。がん細胞の抗がん剤に対する感受性は、がんの発生部位や患者によって異なるため、抗がん剤治療の前には、症例ごとのアッセイを行うことが重要である。しかしながら、今までに認可されている抗がん剤だけで 100 種類あるうえ、最近では実際には二剤・三剤を併用

図3 抗がん剤感受性アッセイシステム

図4 薬剤投与の細胞への影響

することが多いため組合せは膨大な数に上る。現在開発されている薬剤感受性アッセイには、1アッセイあたり細胞が $2\sim 3\times 10^5$ 個程度必要であり、この方法ですべての投与条件をアッセイすることは、時間的制約、また、サンプルの量的制約から不可能である。そこで、この感受性アッセイにマイクロ細胞培養システムを利用すると、細胞量の劇的な低減やハイスループット解析が期待できる。開発したシステムを図3に示す。マイクロチップ内で前項で得られた最適条件でヒトがん細胞を培養し、増殖させたところに抗がん剤入りの培地を供給して投与モデルとした。結果を図4に示す。横軸は投与した抗がん剤の濃度、縦軸は細胞の死亡率を示す。抗がん剤の濃度が高くなるほど、投与時間が長くなるほど、細胞が死滅しており、薬剤の効果を示す結果を得た。用いた細胞数は、1アッセイあたり 2×10^3 個(約10 ng)であり、必要な細胞数を従来法の1/100以上減少させることができた。また、必要な抗がん剤も従来の数μgから数ngに低減できた。細胞培養・薬剤投与・観察のすべての操作は、マイクロシリンジポンプの切り替えのみでできるため、アッセイ全体の自動化や感染の危険性の低減などにも大きなメリットがある。

4. おわりに

従来の細胞を用いたマイクロチップ研究ではその主流はチップ外で培養した細胞の分離や分析などの操作がおもな用途となっていたが、マイクロチップ内での培養技術の向上によって、生命のみならず、細胞の機能も正常に維持す

ることが可能となり、培養細胞をひとつのツールとして用いたさまざまな高機能マイクロデバイスが実現していくものと期待できる。すでに、上で述べたがん細胞を用いた抗がん剤の感受性試験¹⁸⁾のほか、マクロファージの細胞応答機能を利用した薬剤候補物質のスクリーニング¹⁹⁾なども実現している。マイクロチップを用いることにより、試料となる細胞数を2~3桁低減できることから、医療現場で、患者自身の細胞を用いた薬剤の効果や副作用測定が実現でき、テーラーメイド医療の進展に大きく寄与すると期待される。さらに、新しい視点として細胞の機械的機能、たとえば、心筋のポンプ機能をマイクロデバイスに組み込むという研究²⁰⁾にも着手し、他の研究グループから大きな注目を集めている。

文 献

- 1) D. R. Reyes, D. Lossifidis, P. A. Auroux, A. Manz: *Anal. Chem.*, **74**, 2623 (2002)
- 2) D. R. Reyes, D. Lossifidis, P. A. Auroux, A. Manz: *Anal. Chem.*, **74**, 2637 (2002)
- 3) M. A. Northrup, K. F. Jensen, D. J. Harrison, Eds.: *Micro Total Analysis Systems 2003*, Kluwer Academic, 2003
- 4) K. Sato, M. Tokeshi, T. Kitamori, T. Sawada: *Anal. Sci.*, **15**, 641 (1999)
- 5) H. M. Sorouraddin, A. Hibara, M. A. Proskurnin, T. Kitamori: *Anal. Sci.*, **16**, 1033 (2000)
- 6) K. Sato, M. Tokeshi, T. Sawada, T. Kitamori: *Anal. Sci.*, **16**, 455 (2000)
- 7) M. Tokeshi, T. Minagawa and T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **72**, 1711 (2000)
- 8) H. Hisamoto, T. Horiuchi, M. Tokeshi, A. Hibara, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 1382 (2001)
- 9) Y. Tanaka, M. N. Slyadnev, A. Hibara, M. Tokeshi, T. Kitamori: *J. Chromatogr. A*, **894**, 45 (2000)
- 10) K. Sato, M. Tokeshi, T. Odake, H. Kimura, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **72**, 1144 (2000)
- 11) K. Sato, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **73**, 1213 (2001)
- 12) E. Tamaki, K. Sato, M. Tokeshi, K. Sato, M. Aihara, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 1560 (2002)
- 13) A. Hibara, T. Saito, H.-B. Kim, M. Tokeshi, T. Ooi, M. Nakao, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **74**, 6170 (2002)
- 14) A. Y. Fu, H.-P. Chou, C. Spence, F. H. Arnold, S. R. Quake: *Anal. Chem.*, **74**, 2451 (2002)
- 15) E. A. Schilling, A. E. Kamholz, P. Yager: *Anal. Chem.*, **74**, 1798 (2002)
- 16) A. Hibara, M. Tokeshi, K. Uchiyama, H. Hisamoto, T. Kitamori: *Anal. Sci.*, **17**, 89-93 (2001).
- 17) H. Hisamoto, Y. Shimizu, K. Uchiyama, M. Tokeshi, Y. Kikutani, A. Hibara, T. Kitamori: *Anal. Chem.*, **75**, 350 (2003)
- 18) Y. Tanaka, *et al.*: *Proceedings of Micro Total Analysis Systems, 2003*, p. 777
- 19) M. Goto, *et al.*: *Proceedings of Micro Total Analysis Systems, 2003*.
- 20) Y. Tanaka, *et al.*: *Proceedings of Micro Total Analysis Systems, 2003*