

マイクロカプセル化技術による細胞アレイの研究

竹内 昌治*

Study on a Cell Array using Microencapsulation Technology

Shoji TAKEUCHI

This report describes a method to form monodisperse microcages encapsulating cells with poly-L-lysine (PLL) membrane. These microcages were prepared with a monolithic three-dimensional microfluidic axisymmetric flow-focusing device (3D AFFD) using internal gelation method. The production process of microcage is mild enough for cells. The microcages were sufficiently monodisperse and robust to be trapped in a beads-based microfluidic array system for easy observation. We also confirmed that (i) the PLL membrane is semi-permeable, (ii) cells are able to move freely inside the microcages, and (iii) cells can be successfully cultured inside these microcages.

1. 目的

本研究では、カプセル化した細胞を一つのユニットとした3次元組織再生のためのマイクロアレイの開発を目的とする。最終的には、アレイ化された細胞の特性を高速にスクリーニングするデバイスへ応用することを目指す。これらの研究を将来、発展させることによって、肝臓や膵臓などの代謝、分泌機能を模擬できるようなマイクロデバイスの展開をはかる。

近年、マイクロサイズの液滴やハイドロゲルを均一径で大量に作成できるデバイスの研究が盛んである¹⁾。特に、ハイドロゲルへの細胞のカプセル化は、操作や組立が容易に行えるため、チップ上での細胞輸送や3次元組織再生への応用が期待されている²⁾³⁾。しかし、これらは単なる細胞の内包にすぎず、細胞の生存環境に近い状態での培養ができなかった。そこで、本研究では、浮遊細胞や微生物を培養するための、ポリLリジン(PLL)膜で構成された中空カプセルと、接着細胞を培養するための、細胞が3次元に階層化されたマイクロビーズを検討した。また、従来の流路では、精度の悪さや、使用できる溶液に制限があり細胞を内包しづらいという問題があったが、ここでは、3次元マイクロ流路デバイスを試作し、これらの問題の解決を目指した。

2. 実験

2.1. 光造形法による3次元マイクロ流路

2009年3月2日 受理

* 豊田理化学研究所研究嘱託

(東京大学生産技術研究所マイクロメカトロニクス国際研究センター)

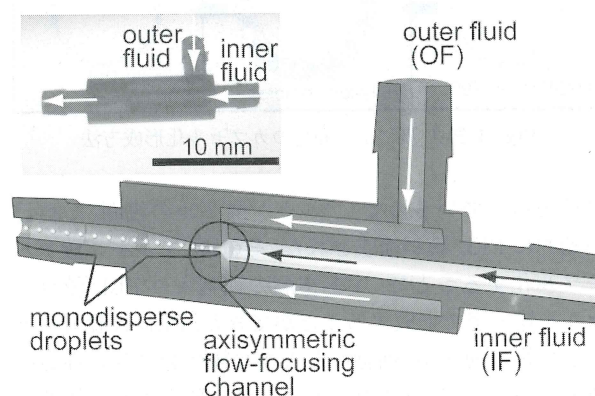


Fig. 1. 光造形法による3次元マイクロ流路

均一直径のハイドロゲルカプセルを作成するために、まずはマイクロ流路を試作することから検討した。ここでは光造形法を用いて、一体型の3次元マイクロ流路を試作した(Fig. 1)。光造形法は3次元構造体を正確に作り上げることができる。このため、光造形法を用いることで、従来の3次元流路に比べて、精度の良いものが作製可能となった。また、提案した3次元マイクロ流路の内部は、2つの溶液を同軸上に送液できる構造を有するため、内側の溶液が外側の溶液に囲まれる。これにより、内側の溶液からできた液滴が、流路内壁面に触れることがないので、溶液の種類に依存することなく液滴を作成できる。

2.2. PLL膜による細胞のカプセル化

アルギン酸ゲルを基として、均一径の中空PLLカプセルを形成した。まず、アルギン酸ゲルに細胞をカプセル化する方法として、3次元マイクロ流路において、内側

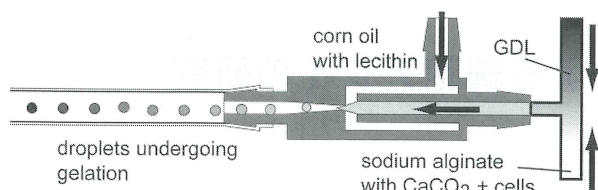


Fig. 2. 細胞のアルギン酸ゲルへのカプセル化

の溶液にアルギン酸と炭酸カルシウムのナノ粒子、グルコノ-1, 5-ラクトン (GDL) と細胞を混合した溶液を使用する方法を提案した (Fig. 2)。この方法により、従来の酢酸を使用する方法に比べ、細胞の生存率を上げてカプセル化することに成功した。次に、この方法により作成された細胞入りアルギン酸ゲルを用いて、PLL 膜カプセルの形成を試みた (Fig. 3)。アルギン酸は負電荷、PLL は正

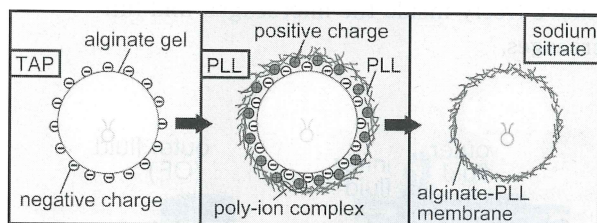


Fig. 3. PLL 膜による細胞のカプセル化形成方法

電荷を持っているので、アルギン酸ゲルの表面に、自己組織的に PLL 膜が構成された。その後、アルギン酸ゲルをゾル化することで、中が空洞の細胞入り PLL 膜カプセルを均一径で形成することができた。PLL は養分など小さな物は通すが、細胞など大きな物は通さない性質を持っているので、カプセル内に細胞を孤立させた状態で長期培養が可能である。これらのカプセルの均一性と機能を示すため、均一径のビーズを配列するためのマイクロ流路デバイス³⁾での配列、内包された細胞の運動性の確認、細胞の培養を行った。

2.3. 接着細胞用マイクロカプセル

上記は浮遊細胞用に検討されたカプセルであるが、接触細胞用に利用可能なマイクロカプセルとしてコラーゲンを利用したものを検討することにした。3次元マイクロ流路において、内側の溶液として、コラーゲンゾルに細胞を懸濁した溶液を使用することで、コラーゲンに細胞をカプセル化した液滴を作成することができた。コラーゲンは熱で固まる性質を持っているので、この液滴を 37℃・45 分の条件でゲル化した。その後、内包した細胞とは違う種類の細胞を外側から培養した。コラーゲンには生分解性の性質があるので、細胞が代謝していき、最終的に内側と外側の細胞が接触した。これにより、異種の細胞同士の階層化された共培養が実現できた (Fig. 4)。この異種細胞による共培養は、内側の細胞を外側の細胞

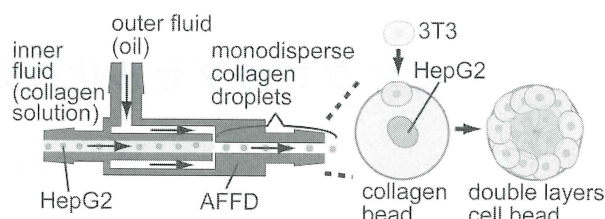


Fig. 4. 細胞の3次元階層ビーズの形成方法

が覆っているという点で、従来の実験系より生体組織に近いものになっている。提案した共培養系における、異種細胞間の相互作用の機能を調べるため、内側の細胞の分泌物質の分泌量と相互作用の比較を行った。また、コラーゲンを足場として作成された細胞玉を、PDMS の型の中に入れて培養すると、細胞で構成された複雑な構造体を作成できることも示した。

3. 結 果

3.1. 3次元マイクロ流路による均一径液滴の作成

光造形法を用いて作製した3次元マイクロ流路により、均一径の液滴を溶液の種類に関係なく作成することが可能になった (Fig. 5)。このデバイスでは、外側と内側

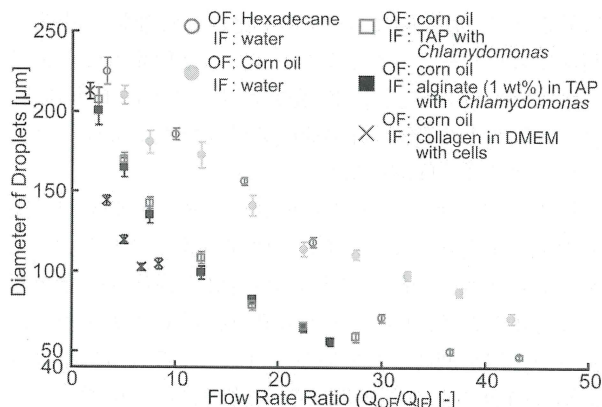


Fig. 5. 3次元マイクロ流路による均一液滴の作成

の流量比を変えることで、作成される液滴の直径を変化することができる。液滴の種類に依らず、均一性を保ちつつ直径が可変できる点は、このデバイスの応用可能性の広さを表している。また、光造形法は精度よく簡単に流路の設計値を変えることができるため、流体力学の見地からの解析も容易になると考えられる。

3.2. PLL 膜による細胞のカプセル化

マイクロ流路デバイスを用いて、PLL 膜で構成されたカプセルの配列 (Fig. 6a) と、カプセル内の微生物の運動の観察 (Fig. 6b) を行った。これにより、これらのカプセルが均一かつマイクロ流路中での操作によって破壊されないこと、カプセル内の微生物の運動が制限されることが示された。この特性は、チップ上での微生物の解

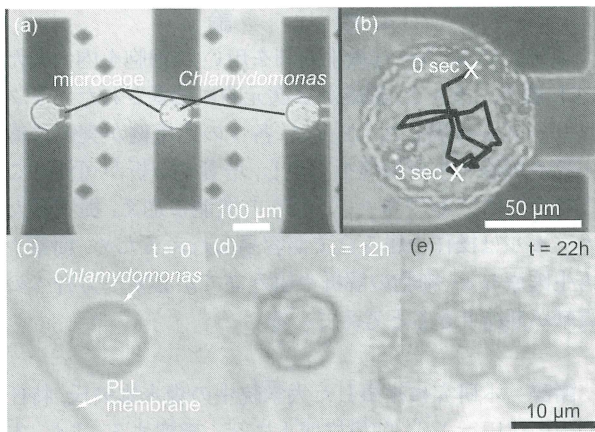


Fig. 6. PLL 膜カプセルの特性

析への応用可能性を実証していると考えられる。また、このカプセル内での微生物の培養にも成功し (Fig. 6c-e), PLL 膜が養分を透過するため、カプセルへの内包が微生物の活性に影響を与えないことが確認された。

3.3. 接着細胞用マイクロカプセル

コラーゲンビーズを足場として作成された、細胞が3次元的に培養されたマイクロビーズを検討した。この際、内側の細胞には肝細胞である HepG2, 外側の細胞には

線維芽細胞である 3T3 を用いた。HepG2 は 3T3 によって覆われており、その中で異種細胞同士の相互作用が行われていると考えられる。この状態での HepG2 の活性を調べるため、HepG2 の分泌物であるアルブミンの産生量を計測した。この結果、3次元階層的に異種細胞の配置することで、HepG2 の活性が上がることを示された。この実験系を用いることで、様々な異種細胞を階層的に配置することが可能になり、相互作用による細胞活性の変化を解明することが期待できる。また、コラーゲンから作成された細胞玉を、PDMS モールドに入れて培養することで、一体化した複雑な構造体を作成することに成功した。この構造体を生死判定したところ、ほぼ全ての細胞が活着していることが確認された。これにより、この方法を用いることで、細胞でできた大型で複雑な構造体を、細胞の活性が保たれたまま作成することが可能になったと考えられる。

3.4. ビーズのアレイ化

細胞やリポソーム、タンパク質の修飾されたマイクロビーズなどを効率的にアレイ化し、薬物動態などを高速で解析するハイスループットスクリーニングが盛んに検討されている。無数の細胞や抗体ビーズをアレイにし、薬物を導入する。その後、一つの細胞やビーズだけを取

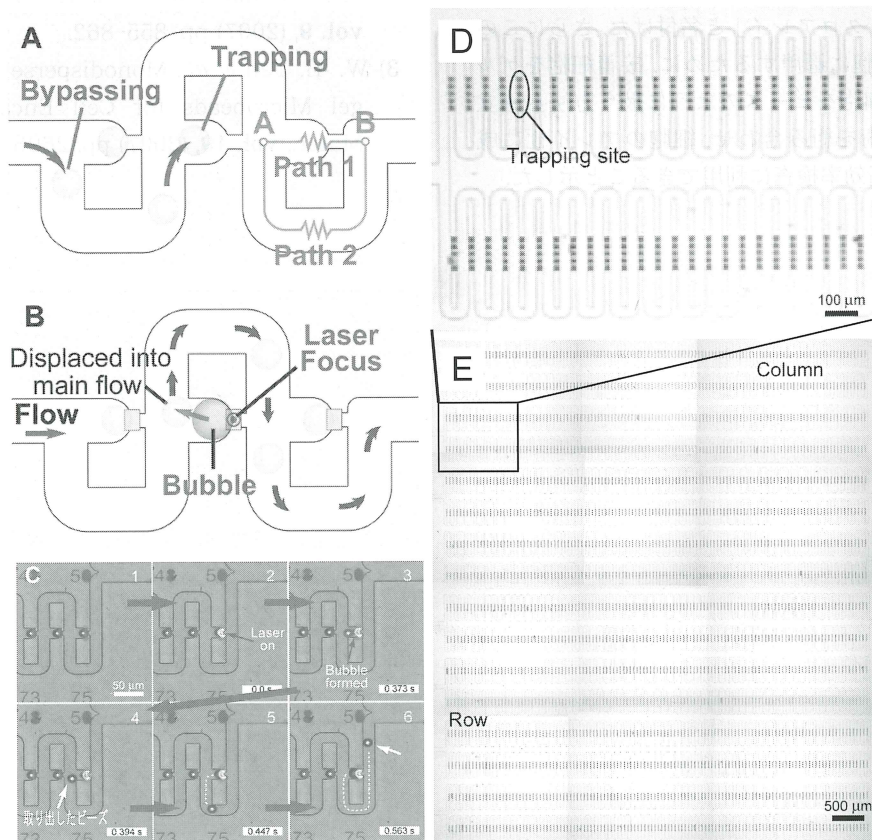


Fig. 7. (A, B) ビーズの捕捉, 取出しが可能なマイクロ流体デバイスの原理. (C) このデバイスを利用してビーズを取り出している様子. (D, E) 1万個のビーズを捕捉した写真とその拡大図.

てきて調べることができれば、後に遺伝子レベルやタンパク質の構造レベルでの詳細な解析が可能である。このようなデバイスの実現のためには、流れが制御しやすい微小な領域で細胞やビーズの位置を制御するのが良い。ここでは、1万個レベルのビーズや細胞を高速でアレイ化し、生化学的な実験後に、アレイの中から一つだけビーズ回収できるシステムを実現した。Fig. 7A, Bに、デバイスの原理を示した。Fig. 7Aはマイクロ粒子のトラップ原理である。Path 1の流路抵抗よりもPath2のほうが大きく設計しているため、最初に粒子は、Path 1を通るが、途中で狭窄しているため、トラップされる。Path 1に粒子がトラップされると、抵抗はPath2の方が下がり、後続の粒子は、Path2を通過する。またFig. 7Bはマイクロ粒子のリリースの原理である。トラップされている位置に、金属薄膜がパターンしてある。この薄膜に光ピンセットのレーザーを照射することによって泡を発生させ、粒子を押し出す。流れが緩やかな場合は、光ピンセットで直接粒子を捕獲し、Path2の流れに押し出すことも可能である。こうして押し出された粒子は、下流で確保できる。候補者らは、このような原理に基づくデバイスを実現し、実際にタンパク質の試薬反応計測に使えることを示した。従来の観察対象が固定されているアレイに対して、実験後に自由に移動させることができることから「ダイナミックマイクロアレイ」と名付けた。さらにこのデバイスを接着細胞に適用するために、接着細胞をゲルビーズで包含し、細胞をビーズのように扱う方法も確立した。これらの技術を組み合わせ、細胞のアレイ化に成功し、薬物動態の高効率検査に利用できることを示した。

4. 結 論

本研究では、均一な微小液滴を用いて、細胞を内包したPLL膜カプセルと、細胞が3次元的に培養されたマイクロビーズを実現した。さらに、各々の応用例が実際の微生物や細胞の生育環境を再現し、培養や解析が可能であることを示すことができた。これらの機能に加え、提案したカプセルは操作や組み立てが容易に行えるため、創薬や再生医療など、細胞の解析や組み立てが必要な分野への貢献が期待できると考えている。

謝辞 本研究に従事した大学院生の森本雄矢氏、特任助教の津田行子氏、陳偉雄博士に深く感謝する。また、本研究の一部は、豊田理学研究所の研究嘱託を受けて行われた。助成金ならびに事務局の手厚い支援に深く感謝する。

参 考 文 献

- 1) A. S. Utada *et al.*, Monodisperse double emulsions generated from a microcapillary device. *Science*, **vol. 308**, (2005) pp. 537-541.
- 2) C. H. Choi *et al.*, Generation of monodisperse alginate microbeads and in situ encapsulation of cell in microfluidic device. *Biomed. Microdev.*, **vol. 9**, (2007) pp. 855-862.
- 3) W. -H. Tan *et al.*, Monodisperse Alginate Hydrogel Microbeads for Cell Encapsulation. *Adv. Mater.*, **vol. 19**, (2007) pp. 2696-2701.