

磁気アルキメデス効果を用いた マイクロ流路内でのスフェロイドアレイ構築

秋山佳丈*

Spheroid Array Formation in Microchannel Based on the Magneto-Archimedes Effect

Akiyama Yoshitake*

This paper demonstrates a method to form and fuse spheroids on a microfluidic chip without cell labeling nor specific pattern of a microchannel. Cell assembly method based Magneto-Archimedes effect became possible by adding a paramagnetic salt into culturing medium to enhance the diamagnetic property of the cells. First, we confirmed that spheroids formed by this method produced albumin as effectively as the ones by a conventional method. Cells in the paramagnetic medium were aggregated ultrarapidly in a microchannel by applying a magnetic field. The spheroids were manipulated by changing the magnetic field. Finally, we also succeeded in fusing two different spheroids into a Janus spheroid on the same chip.

1. 緒言

マイクロ流路中での微小3次元組織モデルの構築は、細胞生物学における細胞動態の評価モデルとしてだけでなく、創薬に向けた薬剤スクリーニングのプラットフォームとしても大変有用である。近年、薬剤の安全性や有効性の評価にはヒト培養細胞での実験系が求められているが、2次元培養では細胞の機能が *in vivo* と比較し著しく劣るなど、結果の乖離が報告されている[1]。そこで、スフェロイド（細胞塊）が、培養皿上の2次元培養に代わる新しいプラットフォームとして期待が高まっている。これまで多くのスフェロイド形成技術が報告されてきた[2]。特に、スフェロイド形成と培養システムのためのマイクロ流路チップが注目され、開発されてきた。しかし、半透膜や特別な微細加工の技術が必要である。

我々はすでに磁気アルキメデス効果を用いたラベルフリー細胞アセンブリ法を提案しており[3]、特殊な微細加工なしでマイクロ流路中でのスフェロイドの形成を実現している[4]。そこで、本研究ではラベルフリー細胞アセンブリ法を用いてマイクロ流路内でのスフェロイドアレイを形成し、3種類のスフェロイドを同時に形成すること、および、流路内でのスフェロイドの非接触で操作し、融合させることを目的とする。

2. 磁気アルキメデス細胞アセンブリ法の原理

溶媒中の粒子にかかる力は以下の式であらわされる。

$$\mathbf{F}_m = \frac{(\chi_p - \chi_m)V}{\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (1)$$

ここで、 χ_p , χ_m は細胞、および培地の磁化率、 V は細胞の体積、 μ_0 は真空の透磁率、 \mathbf{B} は磁束密度である。式(1)より培地中の粒子に働く磁力は細胞と培地の磁化率の差に比例する。よって、鉄やガドリニウムなどの高い磁化率を持つ常磁性塩を十分な量含んだ培地中の細胞は反磁性体粒子として振る舞う（図1）。従って、磁場を印加すると、細胞は磁場に反発し、磁束密度の低い領域に移動する。

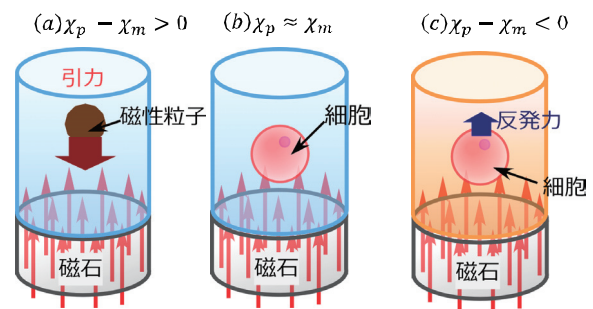


図1. 磁気アルキメデス効果。(a)水の中の磁性粒子、(b)培養液中の細胞、(c)常磁性培養液中の細胞。

3. マイクロ流路内でのスフェロイドアレイの形成

実験装置の概要を図2に示す。2つの流入口と1つの流出口を持つマイクロ流路チップを poly-dimethylsiloxane (PDMS) とガラスプレートにより作製した。流路内部は細胞低接着ポリマーでコーティングした。ネオジム磁石 (5×5×15 mm) を、N極S極が隣り合うように4×4のアレイ状に並べ、その上にマイクロ流路チップを設置した。磁石4つが接する部分に、

2014年3月20日 受理

* 豊田理研スカラー（大阪大学大学院工学研究科高度人材育成センター）

最も磁束密度の小さい領域(低磁場点)が形成され、ここに細胞が凝集する。

ヒト肝がん細胞株 (HepG2) を使用し, CellTracker Red (CTR) もしくは Green (CTG) を用いて蛍光染色した. 細胞懸濁液の濃度は約 4.0×10^5 cells/mL であった. 細胞懸濁液の導入はシリンジを用いて手動で行い, チップ内に層流条件で導入し, 細胞が均一に分散された状態で導入を止めた. その後チップを磁石アレイ上に配置し磁場を印加し, 数時間培養した.

凝集 2 時間後に観察したヤヌススフェロイドを図 3 に示す. チップ内に細胞懸濁液を層流条件で導入することで, 磁石アレイの上に設置後 10 分程度で赤色のみ, 緑色のみ, 赤と緑 2 色のスフェロイド (ヤヌススフェロイド) が形成された [5]. 2 つの細胞懸濁液の界面を低磁場点上になるようにすることでヤヌススフェロイドが形成でき, 懸濁液の濃度, および低磁場点と液界面の位置を変更することで, 赤と緑の比率を変更することができると思われる.

4. マイクロ流路内でのスフェロイドの操作・融合

実験手順を図 4 に示す. 異なる色に完全に染め分けたスフェロイドを形成するため, 途中まで流路壁のあるマイクロ流路チップを用い, 4×3 の磁石アレイを使用した. 2 つの細胞懸濁液をチップに層流条件で導入し, 磁石アレイ上に設置し細胞を凝集させた, 2 時間培養した後, スフェロイドを低磁場点でトラップしながらチップの下流に移動させた. その後スフェロイドに磁石から作用する反発力を利用して近づけ, 低磁場点で 2 つを融合させた.

凝集後 2 時間, 融合したスフェロイドを図 5 に示す. 形成したスフェロイドは磁気アルキメデス効果より, 細胞と同様に磁場により操作することができた [5]. 磁場から受ける力は体積に比例するため, 細胞よりも大きな力がスフェロイドには働き, 磁場による操作はより速くなり, 容易であった.

5. 結論

磁気アルキメデス効果を用いたラベルフリー細胞アセンブリ法により, チップ内でのスフェロイドの形成を実証した. 特に, 異なる 2 色に染色した細胞を層流条件下でチップに導入することで, 3 種類のスフェロイドを同時に形成した. さらに, 形成したスフェロイドを磁場により操作し, 融合させることにも成功した. 今後, 電磁石を用いて, 動的磁場を発生させることで, より容易にスフェロイドの融合や回収操作を行いたい. また, 本手法により, 微小 3 次元組織構築だけでなく, 複雑な 3 次元組織構築に向けても研究を進めていきたい.

REFERENCES

- (1) A. Abbott, Nature, 424(6951), 870-872 (2003).
- (2) R. Lin & H. Chang, Biotechnol. J., 3, 1172-1184 (2008).
- (3) Y. Akiyama & K. Morishima, Appl. Phys. Lett., 98(16), 163702 (2011).
- (4) Y. Akiyama et al., Proc. MEMS2012, 116-119 (2012)
- (5) N. Sho et al., Proc. microTAS 2014, 754-756, (2013).

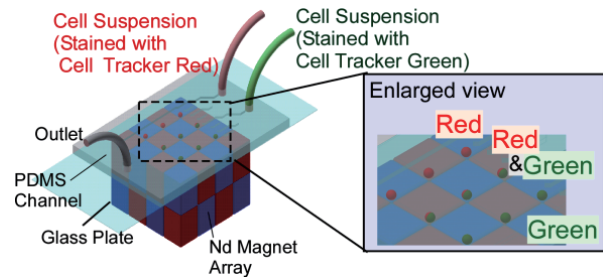


図 2. マイクロ流路内での各種スフェロイドの同時形成.

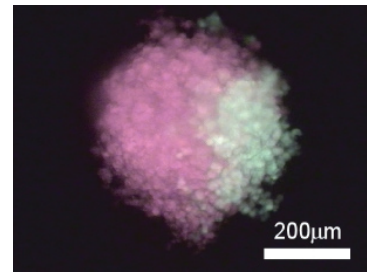


図 3. マイクロチャンネル内で形成されたヤヌススフェロイドの蛍光像.

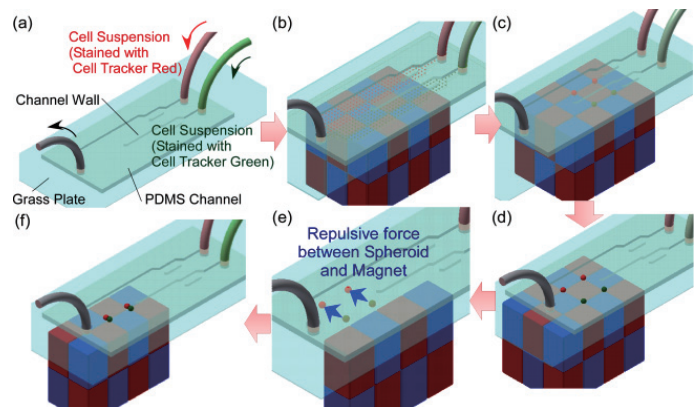


図 4. マイクロ流路内でのスフェロイド形成とその融合.

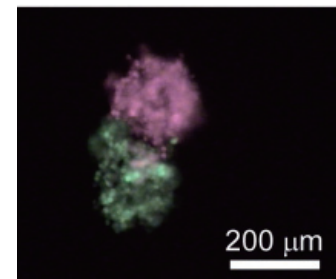


図 4. マイクロチャンネル内で形成されたスフェロイドを融合したものの蛍光像.