

心筋細胞を駆動素子としたバイオマイクロポンプの創製

東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 博士課程2年 田中陽

1. 緒言

通常、機械は電力によって駆動するが、我々の心臓は電力を要さず、血液中の栄養や酸素のみで駆動する。心臓のように化学エネルギーのみで駆動する、電力の利用から脱却した新原理の機械を創ることができないか？このような発想を、細胞の機能を利用して実現するのが私の研究テーマである¹⁻³。

従来の化学操作をマイクロチップと呼ばれる数 cm 角の基板上に集積して、分析化学装置や小型反応器などへ応用する研究が近年注目されている^{4,5}。この研究分野は、 μ TAS(Micro Total Analysis Systems)または Lab on a Chip などと呼ばれており、ガラスやポリマーなどの基板上に微細加工技術を利用して作製した μm オーダーの流路を反応や分析の場として利用するものである。微小空間内では、マクロスケールにはない、サイズに起因する様々な特徴がある。例えば、流路内の空間が狭いため、物質移動が律速となる反応に要する時間を大幅に短縮できること⁶、比界面積（表面積あたりの空間の体積）が大きいこと、固・液・気相間の様々な反応を高効率に進められること⁷などが挙げられる。このような特徴を利用して、従来の実験装置の小型化や実験に使用する試薬の低減だけでなく、これまで数日かかっていた医療診断分析のための反応を数分で完了させる⁸など、実験システムの大幅な高効率化が可能となる。

一方、細胞などの微生物は、その微小な体内で特異性の高い生化学プロセスを効率的に進めており、きわめて高度かつ多彩な機能を有している。肝細胞の解毒作用、血管内皮細胞の血管拡張作用、そして心筋細胞の伸縮運動機能などはその代表的な例である。このような細胞機能は、現在の加工技術で作製された機械に比べ、集積度や効率などの点においてはるかに高性能であり、しかも電力を要さず栄養や酸素などの化学エネルギーのみで機能する。ゆえに、マイクロチップに細胞を培養し、その機能を組み込むことは、マイクロチップをさらに飛躍的に高効率化させるだけでなく、従来の機械の作動原理を根本的に革新する可能性を拓き、学術や産業の発展にとって非常に有意であると考えられる。

このような発想のもと、私は今回、細胞の機能を用いた機械のプロトタイプとして、心筋細胞の伸縮運動機能を利用したバイオマイクロポンプの創製に取り組んだ。これまでにマイクロチップの流路内に培養した細胞の生化学的機能をセンサーとして利用する高効率な生化学分析システムが開発されてきたが^{9,10}、細胞の力学的機能を利用するという例はほとんどなかった。なぜなら、細胞の生化学的な応答を測定するためには、微量の細胞シグナルであっても感度の高い装置を使えば検出が可能であるが、細胞の力学的機能を利用するためには構造物や流体を駆動させねばならず、これには相当の力が必要だからである。

細胞一個や数個では変位や力が小さいため、その動きはほとんど役に立たない。細胞の力学的機能の利用のためには細胞自体の変位と力を増幅させる方法が必要である。

そこで着想したのが細胞シートの利用である。細胞シートとは、本来は患者本人の細胞を用いて臓器を構築する再生医療を目的として開発されたものであり、細胞培養皿表面に固定化した温度応答性高分子、ポリイソプロピルアクリルアミドを、温度を下げることで細胞接着性の疎水性から非接着性の親水性へと変化させ、細胞をシート状で剥離したものである¹¹。これを、心筋細胞に応用したものが心筋細胞シートである。心筋細胞は、単独でも血液中または培養液中のブドウ糖のみで自立拍動するが、心臓そのものに見られるように、細胞同士が接触することにより細胞の拍動が同期することが知られている。一辺 1 cm の正方形心筋細胞シートは数百万個の細胞からなるため、全体が同期して伸縮運動し、細胞一個または数個に比べ、はるかに大きな変位、力を発生できる¹²。以上をふまえ、心筋細胞シートを利用したバイオマイクロポンプ（心筋ポンプ）を具体的に設計した。

2. 設計

今回考案・設計した心筋ポンプを図 1 に示す。基本的な構造は、機械的なマイクロポンプとして最も一般的に用いられているダイヤフラム式マイクロポンプの形状¹³に準じており、チャンバー上の膜（ダイヤフラム）を振動させることでチャンバーの体積を変化させ、チャンバーの出入りに装着した逆止弁により送液するというものである。チップの大きさは、扱いやすい一辺 2 cm の正方形とした。

設計上最も重要なのが、心筋細胞シートの弛緩・収縮運動を流体（培養液）に伝えるための構造である。今回、プッシュバーと呼ばれるピストンヘッド型の構造物を利用した。この構造に心筋細胞シートを覆い被せる形で接着させることにより、側面の部分の「縮む」方向の力を、ダイヤフラムを「押す」方向の力へと変換できる。また、細胞に十分なエネルギーを与えるため、系全体は培養液中に入れることとした。

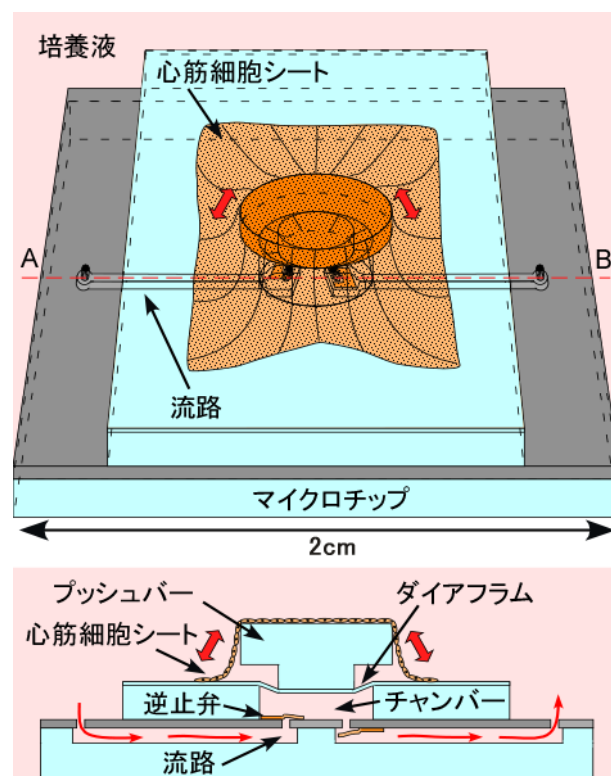


図 1. 心筋ポンプのデザイン。(上) 概観図。(下) A-B での断面図。

3. 心筋細胞による流体駆動の実証

まず、逆止弁なしで心筋細胞シートによる流体駆動が可能であることを確かめた。

(1) マイクロチップの作製

最初に、心筋細胞シートと逆止弁を除いたマイクロチップのパーツをフォトリソグラフィにより作製した。これは、シリコン基板上に紫外線感光性高分子（フォトレジスト）を塗り、この上に微細なパターンを印刷したマスクを重ねて紫外線を照射し、感光した部分のみを硬化させて現像することにより、微細な構造物を作製する手法である。

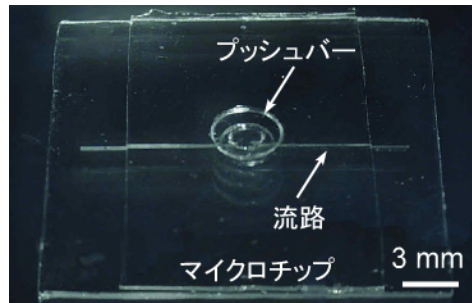


図 2. マイクロチップの写真。

作製した構造物を、透明なシリコンゴムの一種であり、生体適合性のある鋳型材料でもある高分子、ポリジメチルシロキサン (PDMS) で鋳型をとり、幅・深さ $200\ \mu\text{m}$ の流路、径 $3\ \text{mm}$ 、深さ $500\ \mu\text{m}$ のチャンバーを作製した。次に、作製したパーツを組み合わせ、マイクロチップを完成させた (図 2)。細胞接着のため、チップを消毒、紫外線滅菌した後、細胞接着性タンパク質のフィブロネクチンで表面をコーティングした。

(2) 心筋細胞シートの移植

次に、心筋細胞シートをマイクロチップに移植した。まず、新生ラット (Wistar 種、0 日齢) の心臓から摘出・遊離された心筋細胞を温度応答性培養皿上で 4 日間培養した後、温度を通常培養温度である $37\ ^\circ\text{C}$ から $20\ ^\circ\text{C}$ に下げ、心筋細胞を一边 $1\ \text{cm}$ の正方形のシート状で剥がした。これをピペットで吸い上げ、マイクロチップ中央に吐出し、培養液を吸い上げることでチップに接触させた。

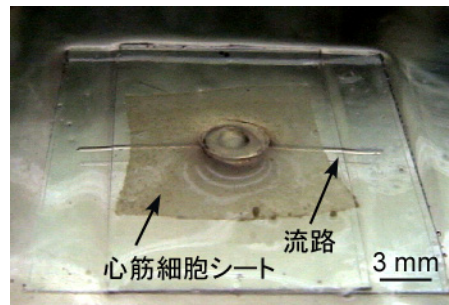


図 3. 心筋細胞シートを接着させたマイクロチップの写真 (逆止弁なし)。

その後、培養条件として最適な温度 $37\ ^\circ\text{C}$ に設定した細胞培養装置インキュベータで 1 時間静置し、細胞とチップ表面のタンパク質を結合させ、心筋細胞シートをチップに完全に接着させた。細胞シート接着後のマイクロチップを図 3 に示す。接着後、マイクロチップが完全に浸かるように培養液を十分に満たした。移植直後は心筋細胞の動きが弱かったため、しばらく培養を続けた。

(3) 心筋細胞による流体駆動の確認

細胞シート移植 3 日後、作製した流体駆動装置の駆動を確認するため、図 4(A)のように、直径 $1\ \mu\text{m}$ のポリスチレン微粒子をまぜた培養液を、微小流路に注入し、その動きを $37\ ^\circ\text{C}$ において顕微鏡観察し、動画を記録した。動画から、右側流路中央付近の粒子の動きを測定し、時間に対してプロットした。ある時間 $t = 0\ \text{s}$ のときの粒子の変位 $x = 0\ \mu\text{m}$ とし、 $1/30$

秒間隔で4秒間測定した。

粒子の動きを図4(B)に示す。心筋細胞の拍動に同期した粒子の拍動が確認され、その拍動数(= f とおく)は0.7 Hz、最大の変位(= x とおく)は150 μm であった。なお、ベースラインの小刻みな振動はブラウン運動によるものである。また、反対側の流路においても同様の粒子拍動が観察された。流体の拍動は、培養液を交換することで、1週間近く持続できた。

次に、得られたデータから駆動性能を見積もった(図4(A)参照)。まず、心筋細胞シートの収縮による流路内の流体の体積変化量(= Δv とおく)は、粒子の変位量と流路の形状から次式(1)で計算される。

$$\Delta v = 0.47 x w d \quad (1)$$

ここで、 w は流路幅、 d は流路深さである。ここでは、 $w=d=200 \mu\text{m}$ 、 $x=150 \mu\text{m}$ なので、 $\Delta v=2.8 \text{ nL}$ である。また、チャンバー内の体積変化量(= ΔV とおく)は、マイクロチップの対称性から、次式(2)で求められる。

$$\Delta V = 2\Delta v \quad (2)$$

上で求めたように、 $\Delta v=2.8 \text{ nL}$ なので、 $\Delta V=5.6 \text{ nL}$ である。さらに、順流に対する抵抗がなく、逆流もしない理想的な逆止弁を装着したと仮定したときに期待される流量(時間あたりに進む流体の体積= Q とおく)は、測定された拍動数(f)およびチャンバー内の体積変化量(ΔV)から、次式で求められる。

$$Q = f\Delta V \quad (3)$$

ここでは、 $f=0.7 \text{ Hz}$ 、 $\Delta V=5.6 \text{ nL}$ なので、 $Q=0.24 \mu\text{L}/\text{min}$ である。

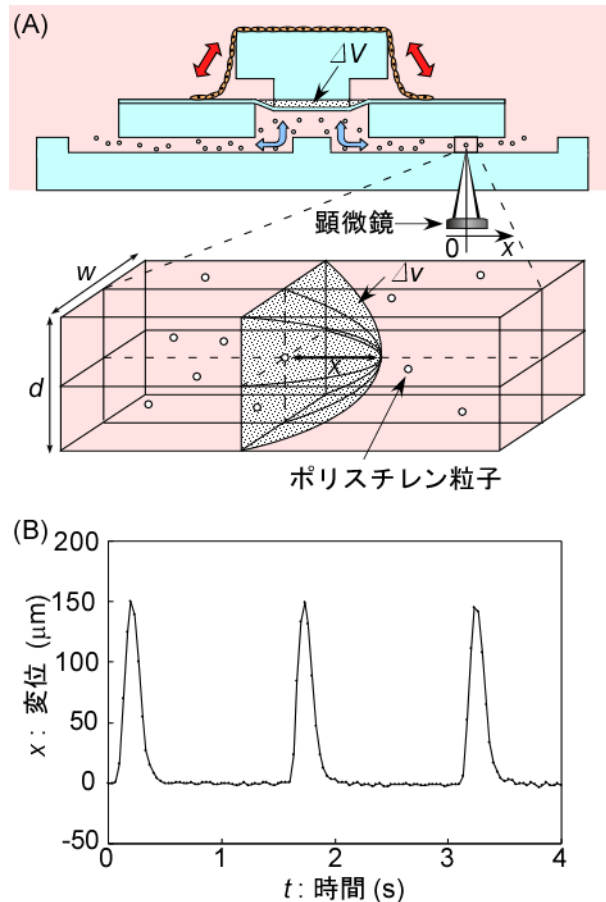


図4. 流路内粒子の変位測定。(A) 流路内の流体観察方法および測定パラメータ。 x :粒子変位、 Δv :流路内体積変化量、 ΔV :チャンバー内体積変化量、 w :流路幅、 d :流路深さ。(B) 粒子変位の時間変化。

4. 心筋細胞によるポンプ機能の実証

次に、逆止弁を装着してポンプ機能を実証した。

(1) 逆止弁の作製

逆止弁の材料としてポリイミドを選んだ。ポリイミドは、金属に代表される無機材料に比べて柔軟で、機械的耐久性も高く、光感光性ポリイミドを用いれば複雑な微細加工も可能であるため、ICチップ関連をはじめ、様々な工業分野に利用されている材料である。

ポリイミドを材料とした逆止弁の構造およびそれを用いた流体の送液原理を図5に示す。今回は、マイクロポンプによく用いられる構造として、片持ち梁型¹³を採用した。弁は、順流に対しては駆動部分が流路穴から離れて流体を通過させ、逆流に対しては駆動部分が流路穴を塞いで流体を遮断する。これを、チャンバーの入口、出口の両方に設置し、ダイヤフラムに力を加えてチャンバーの体積を変化させることで、流路およびチャンバー内の流体を一方向に送液できる。

このような逆止弁を以下のような手順で作製した。まず、後で弁と基板の間に隙間を作るために銅をステンレス基板両面の流路穴部分にメッキした。次に、この上に光感光性ポリイミドをラミネートし、逆止弁の形状にパターンニングした。さらに、弁の反対側から専用の溶液で基板に穴を開けて流路穴を作製し、最後に銅を溶かして逆止弁を完成させた。作製後、逆止弁をマイクロチップに装着し、手で送液できることを確認した。

(2) 心筋細胞によるポンプ機能の確認

心筋細胞シートによる流体駆動法と逆止弁を組み合わせ、心筋ポンプの駆動を実証した。マイクロチップの作製法、心筋細胞シートの移植法は上述の方法と同様である。作製した心筋ポンプの写真を図6に示す。チップの大きさや流路・チャンバーのサイズなどは逆止弁なしのものと同じである。

心筋細胞シート移植直後、逆止弁なしのときと同様、作製した流体駆動装置の駆動を確認するため、図7(A)のように、直径1 μ mのポリスチレン蛍光微

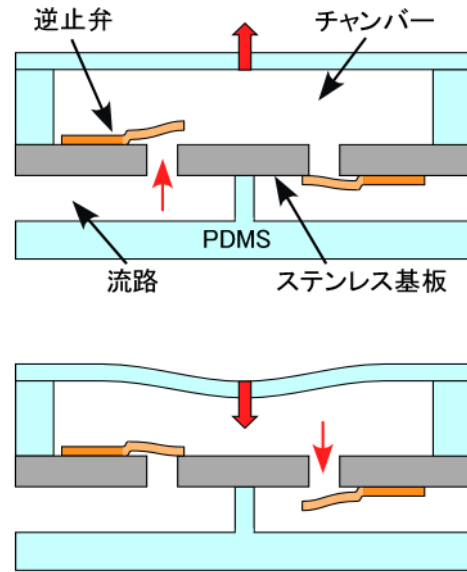


図5. 逆止弁の構造と駆動原理断面図。(上) チャンバー拡張時。(下) チャンバー収縮時。

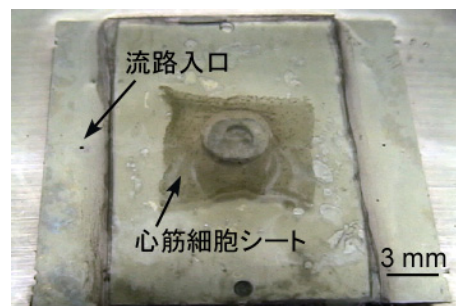


図6. 心筋細胞シートを接着させたマイクロチップの写真(逆止弁つき)。

粒子を混ぜた培養液を流路に注入し、その動きを 37 °C において蛍光顕微鏡観察し、動画を記録した。ここでは、通常の位相差観察に利用する透過光ではステンレス基板を透過しないため、反射光を利用する蛍光観察法を利用した。動画から、入口側と出口側両方の流路中央付近の粒子の動きを測定し、時間に対してプロットした。それぞれ、ある時間 $t = 0 \text{ s}$ のときの粒子の変位 $x = 0 \text{ }\mu\text{m}$ とし、1/30 秒間隔で 10 秒間測定した。入口側、出口側それぞれの流路内の粒子の動きを図 7(B), (C) に示す。

入口側では、粒子は前進と停滞を繰り返しながら移動し、なだらかな順流が確認された。一方、出口側においても、前進、後退、停滞を繰り返しながらも全体として順流が確認された。後退の原因は、逆流に対して出口側の逆止弁が完全に閉じていないからと考えられる。また、一回の拍動に対する粒子の変位は逆止弁なしのときより 1 桁小さくなったが、これは弁の順流に対する抵抗のためと考えられる。出口側は粒子の動きが大きく、拍動の周期が求められた。拍動数 $f = 0.6 \text{ Hz}$ であり、逆止弁なしのときとほぼ同じ大きさであった。

以上のように、入口側、出口側両方の正味の順流が確認されたことにより、心筋細胞によるポンプ機能が実証されたといえる。粒子の速度 ($=u$ とおく) は入口、出口側ともほぼ等しく、 $u = 0.1 \text{ mm/min}$ であり、これに対する流量は、式(1)と同様に流路形状から次式(4)より求められる。

$$Q = 0.47 u w d \tag{4}$$

ここで、 $w = d = 200 \text{ }\mu\text{m}$ であるので、 $Q = 0.002 \text{ }\mu\text{L/min}$ である。

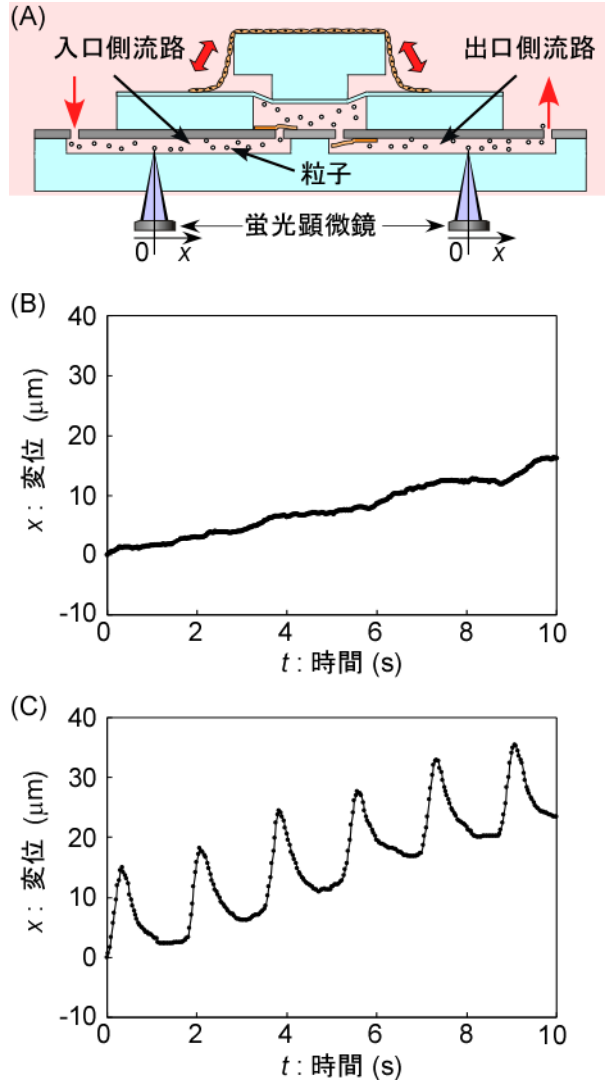


図 7. 流路内粒子の変位測定。(A) 流路内の流体観察方法。(B) 入口側流路内粒子変位の時間変化。(C) 出口側流路内粒子変位の時間変化。

(3) ポンプの性能評価

測定したポンプ流量を比較評価する。1 $\mu\text{L}/\text{min}$ 以下の流量は、マクロスケールでの使用に十分とはいえないが、マイクロチップ内では様々な反応に利用できる。マイクロチップ内での分析や細胞培養には 0.01~1 $\mu\text{L}/\text{min}$ の流量が適している^{8,10}。これは、逆止弁を装着して測定した流量 0.002 $\mu\text{L}/\text{min}$ では足りないが、逆止弁なしで見積もった流量 0.24 $\mu\text{L}/\text{min}$ では満たせる条件であり、逆止弁を改良し、抵抗と逆流を低減すれば心筋ポンプの応用範囲が広がると期待できる。すなわち、細胞の大きさに適し、その能力を最大限に活用できるマイクロチップの利用により、応用も視野に入れた心筋ポンプが実現できたといえる。

5. 結言

電力に依存した従来の作動原理を根本的に革新する機械のプロトタイプとして、心筋細胞を利用したバイオマイクロポンプを創製できた。

心筋ポンプは、次のような様々な応用が考えられる。例えば、体外における擬似心臓としての応用である。マイクロチップ上で、他の細胞や組織と組み合わせて生体を微小化した系を構築し、動物実験の代替として医薬品などの検査に利用できるであろう。また、体内埋め込み型装置としても応用できる。心筋ポンプの拍動数を心臓そのものと同期させておき、心拍数が上がったときに自動的に心拍数を抑える薬物を放出するドラッグデリバリーシステムとしての利用などが考えられる。このような実用化に向けた最も大きな課題としては、寿命の問題がある。現在の寿命は 1 週間程度であるが、培養条件等を最適化し、本物の心臓に近い寿命を保てるようにする必要がある。

はじめにも述べたように、心筋ポンプは電力を要さないという大きな特徴をもつ。細胞はきわめてクリーンかつ安全な化学エネルギーである ATP (アデノシン三リン酸) を力学的エネルギーへ高効率に変換する。このような機械を生体の機能を借りずに実現することは現在の技術では困難であるため、心筋ポンプは新原理の機械開発のための重要な足がかりとなるであろう。

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を賜りました東京大学大学院工学系研究科の北森武彦教授に深くお礼申し上げます。また、協力していただきました東京農工大学共生科学技術研究部物質機能科学部門の森島圭祐助教授、東京大学大学院工学系研究科の佐藤香枝助手、ならびに細胞シートに関する技術を提供していただきました、東京女子医科大学先端生命医科学研究所の岡野光夫教授、大和雅之助教授、菊池明彦助教授、清水達也講師に心より感謝いたします。

参考文献

1. Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, T. Kitamori, *Lab Chip* **6**, 230-235 (2006)
2. Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, T. Kitamori, *Lab Chip* **6**, 362-368 (2006)
3. K. Morishima, Y. Tanaka, M. Ebara, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, T. Kitamori, *Sens. Actuators B, Chemical*, in press
4. D. R. Reyes, D. Iossiidis, P. Auroux, A. Manz, *Anal. Chem.* **74**, 2623-2636 (2002).
5. P. Auroux, D. Iossiidis D. R. Reyes, A. Manz, *Anal. Chem.* **74**, 2637-2652 (2002).
6. D. J. Beebe, J. S. Moore, J. M. Bauer, Q. Yu, R. H. Liu, C. Devadoss, B.-H. Jo, *Nature* **404** 588-590 (2000)
7. J. Kobayashi, Y. Mori, K. Okamoto, R. Akiyama, M. Ueno, T. Kitamori, S. Kobayashi, *Science* **304**, 1305-1308 (2004)
8. K. Sato, M. Yamanaka, T. Hagino, M. Tokeshi, H. Kimura, T. Kitamori, *Lab Chip* **4**, 570-575 (2004)
9. S. Takayama, J. C. McDonald, E. Ostuni, M. N. Liang, P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov, G. M. Whitesides, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5545-5548 (1999)
10. M. Goto, K. Sato, A. Murakami, M. Tokeshi, T. Kitamori, *Anal. Chem.* **77**, 2125-2131 (2005)
11. M. Ebara, M. Yamato, T. Aoyagi, A. Kikuchi, K. Sakai, Teruo Okano, *Biomacromol.* **5**, 505-510 (2004)
12. T. Shimizu, M. Yamato, Y. Isoi, T. Akutsu, T. Setomaru, K. Abe, A. Kikuchi, M. Umezumi, T. Okano, *Circ. Res.* **90**, e40-e48 (2002)
13. D. J. Laser, J. G. Santiago, *J. Micromech. Microeng.* **14**, R35-R64 (2004)