



Title	DEVELOPED CENTRIFUGAL MICROFLUIDIC CHIP FOR SINGLE-CELL LEVEL CARDIOMYOCYTE STUDY
Author(s)	Espulgar, Wilfred
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/53985
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Wilfred Villariza Espulgar)	
Title	DEVELOPED CENTRIFUGAL MICROFLUIDIC CHIP FOR SINGLE-CELL LEVEL CARDIOMYOCYTE STUDY (遠心型マイクロ流体チップを用いる心筋細胞の1細胞解析)
Abstract of Thesis Microfluidics is a multidisciplinary field that deals with the manipulation of fluids that are geometrically constrained in a small (sub-millimeter) scale. This technology can be utilized in a variety of cell-related applications such as cell manipulation, cell separation, cell culture, and cell lysis. Culturing at the microscale level allows control over microenvironmental cues, such as cell-cell and cell-matrix interactions; the potential to scale experiments; the use of small culture volumes; and the ability to integrate with microsystem technologies for on-chip experimentation. There have been a couple of studies of biological cells in a microfluidic chip. However, most chips require large auxiliary equipment like syringe pumps to maintain the cell culture and basic technical knowledge for operation which limits the application of microfluidics and its integration to common laboratory procedures. This study presents the detailed discussion on the assembly and usage of the developed microfluidic chip for single-cell level study of cardiomyocytes and its relevance. Cardiomyocyte cells are the contractile unit of the heart that is responsible for its rhythmic beating. Contrary to common beliefs, the framework in explaining how cardiomyocytes function still lacks in determining if these cells proliferate or regenerate, how they couple and form a network, the response mechanism to different drugs and many other more. These phenomena are usually masked by the average response from a cell population where cell heterogeneity is not taken into account. That is why, analysis at individual cell level is the best approach. This study aimed to develop a platform in studying cardiomyocytes at single cell level by utilizing centrifugal microfluidics. Centrifugal microfluidics is desired because of its simplicity in manipulating fluids by just a change in the rotation speed. In the case of a pump-based microfluidic device, several pumps and interconnects are needed for several inlets to be operated in parallel. With centrifugation-based approach, multiple isolated single cells or groups of cells can be easily prepared and studied. Preparing and observing a large number of isolated single cells has been a painstaking task in conventional petri dish approach and limits single cell level analysis. In addition, video microscopy, a non-invasive approach, was utilized in long term monitoring of the observed cells which is believed to provide insights on its <i>in vivo</i> pathophysiology. Immunostaining, a standard cell study tool, and other optical imaging analysis were successfully demonstrated in the fabricated Polydimethylsiloxane (PDMS) device as well as it's applicability for pharmacological reaction profiling comparison of single and group of cardiomyocytes. With this study, it expected that the developed microfluidic chip can aid in understanding the cardiomyocyte behavior for arrhythmia therapy, tissue engineering, and drug admission appropriateness.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Wilfred Villariza Espulgar)			
論文審査担当者	(職) 氏 名		
	主 査	教授	民谷 栄一
	副 査	教授	井上 康志
	副 査	教授	高村 禅 (北陸先端科学技術大学院大学)
	副 査	准教授	藤田 克昌
論文審査の結果の要旨 生体を理解する上で、構成する細胞の動的変化を 1 細胞レベルでかつ網羅的に解析する手法の開発が求められている。本論文では、心筋組織を構成するヘテロな細胞集団を 1 細胞ずつ配置し、生きたままの状態での細胞の分化、誘導、機能解析を行なうことが可能な微小流体細胞チップの設計と創成を行っている。また、これを実際の心筋細胞の拍動解析や薬物応答解析などへと展開している。以下に、本論文における成果をまとめている。 (1) 独自の遠心回転型の微小流体チップを用いて心筋細胞を 1 個ずつ配置し、分化誘導を行うための流体構造の設計や用いるチップ材料の最適化を行った。その結果、細胞間の相互作用を誘起するには 20 μ m 間隔、細胞が単独に分化するためには 50 μ m 間隔の流体チップ構造が有効であることを見いだしている。また、ポリジメチルシロキサン材料を用いて作成した微小流体チップにより最大で 90% の心筋細胞を 1 個ずつ配置できることを見いだしている。さらにチップ上で捕捉した細胞の 80% 程度が成長分化し、その内 30% 程度が拍動現象を示すことも明らかにしている。 (2) 遠心回転型の微小流体チップにより捕捉した心筋細胞を顕微画像解析法により拍動状態を計測、解析した。ここでは、撮影動画の時間微分より得られた画像運動スペクトルを基礎に心筋の伸縮と弛緩の強度を定量化できた。5 日間にわたる培養経過を生きた状態を保持したまま継続的に計測できることが示された。得られた拍動のプロファイルより心室および心房へ分化する心筋細胞の特性を明らかにした。また、細胞の β-アクチンを免疫染色したところ、1 細胞内での規則的な分布が示され、心筋細胞の拍動方向との相関を明らかにしている。 (3) 心筋細胞を配置した微小流体チップを用いて心筋に作用する各種薬物の応答を拍動解析により評価した。イソプロテレンール(β 受容体刺激剤)、バラパミル(カルシウムイオンチャネル阻害剤)、キニジン(ナトリウムイオンチャネル阻害剤)、プロプラノロール(β 受容体遮断剤)、ソタロール(カリウムイオンチャネル阻害剤)を種々の濃度でチップ上の細胞に作用させ、拍動頻度との相関を調べたところ、臨床データの結果と整合することを示され、本拍動画像解析法が薬効評価法として応用可能であることが示された。また、1 細胞での薬物応答を拍動の時間プロファイルとして調べたところ、1 細胞ごとに異なる特性を示し、心筋細胞集団を構成する細胞のヘテロ性を明らかにするうえで、1 細胞解析を可能にする本システムは、極めて意義があると考えている。 以上のように、本論文では、心筋組織を構成する細胞を 1 細胞ごとに網羅的に配置する遠心回転型の微小流体チップと細胞動態の拍動画像解析などの光学的な計測手法と連携したシステムを開発し、これを用いて心筋細胞の分化過程や薬物応答の解析へと展開した。このように、1 細胞の有する動的特性を明らかにする解析デバイスとして応用物理学、特にバイオデバイス分野に寄与するところが大きい。 よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。			