

2019年度 生物工学奨励賞（照井賞） 受賞



圧力駆動型 Microphysiological systems の開発

杉浦 慎治



Development of Pressure Driven Microphysiological Systems

Shinji Sugiura (*Biotechnology Research Institute for Drug Discovery, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Central 5th, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8565*) *Seibutsu-kogaku* **98**: 123–129, 2020.

Microphysiological systems への期待

近年の医薬品開発のコストは指数関数的に増加しており¹⁾、臨床試験の成功率も年々低下している²⁾。この原因の一つとして、動物とヒトの種差により動物実験の結果を臨床試験に直接的に外挿できないことがあげられる。このような状況の中、ヒト由来の培養細胞を用いたインビトロアッセイに対する期待が高まっており、特に、微細加工技術を用いた生体模倣デバイス Microphysiological systems (MPS) に対する注目が集まっている。MPS という言葉は、マイクロスケールで細胞や細胞周囲の環境を制御することで生理学性を向上させた培養系と捉えることができるが、この中にはマイクロ流体デバイス上で臓器レベルの機能をモデル化した Organ-on-a-chip や、動物の個体応答をモデル化する Body-on-a-chip などが含まれる。

Organ-on-a-chip はマイクロ流体デバイス上で臓器特有の三次元組織構造や血流、動きを再現し、*in vitro* で臓器機能を再現する新しい培養法として注目されている³⁻⁵⁾。Organ-on-a-chip という言葉が定着するきっかけとなった研究として、米国の Wyss Institute の Donald Ingber らの Lung-on-a-chip の開発研究があげられる。呼吸時の肺胞の伸縮をシリコン樹脂の柔らかさを利用して模倣したデバイスを開発し、シリコン樹脂の薄膜の両面にそれぞれ肺胞上皮細胞と血管内皮細胞を配置した培養肺モデルを構築することで、肺への細菌感染と生体の免疫応答を精度良く観測できることが示されている⁶⁾。

同様のチップで腸の組織を作製し、蠕動運動を模倣することで、腸管細胞の柔毛様突起構造が自発的に形成されることが報告されている⁷⁾。また、複数の研究グループより、マイクロ流体デバイスを用いて培養液の流れによる生理学的なせん断応力を負荷することで、血液脳関門のバリア能の向上⁸⁾、腎尿細管のグルコースの再吸収機能の発現⁹⁾や胎盤の微絨毛形成の促進¹⁰⁾なども報告されている。

複数の臓器モデルを連結した Multiorgans-on-a-chip や Body-on-a-chip は、通常であれば動物実験や臨床試験が必要とされる「動物の個体としての応答」を検出する評価技術として期待されている^{11,12)}。複数の臓器を連結した培養方法は、歴史的にはコーネル大学の Michael Shuler らによって開拓された。初期の研究では cell culture analog (CCA) と呼ばれる mL サイズのフラスコ型培養器を連結した研究が報告されている^{13,14)}。その後、微細加工技術によって加工された micro-CCA を用い、モデル化合物ナフタレンの肝代謝物の肺に対する毒性を検出することに成功している^{15,16)}。このように、Multiorgans-on-a-chip は理論的には複数の臓器間の相互作用を考慮したうでの毒性や薬効を検出できる¹⁷⁾。これまでに肝代謝物の毒性や抗がん活性を検出するデバイスが報告されており¹⁸⁻²⁰⁾、心臓、肝臓、神経、骨格筋といった複数の臓器への毒性を同時に検出するデバイスも報告されている²¹⁾。また、多数の Organ-on-a-chip を接合することで、ヒトでの薬物動態を予測する手法も提案されている²²⁾。学術的には Multiorgans-on-a-chip を利用して臓器間相

著者紹介 産業技術総合研究所創薬基盤研究部門（上級主任研究員） E-mail: shinji.sugiura@aist.go.jp

相互作用を網羅的に解析する研究も報告されており、腸と肝臓を結合したデバイスを用いて、炎症発生において腸と肝臓が協奏的に相互作用する例が報告されている²³⁾。このような期待の中、Organ-on-a-chipやMultiorgans-on-a-chipを用いた製品やサービスを提供する数々のスタートアップベンチャー企業が海外を中心に立ち上がっている^{5,24)}。

以上のように、MPSは新たな培養ツールとして創薬や化成品の開発への応用が期待されているが、化合物評価に応用するためには複数の化合物を異なる濃度で添加して評価する必要がある、できるだけ高い培養スループットが求められる。一方、初期の多くのMPSでは、チップ外部のシリンジポンプ^{20,25)}やペリスタポンプ^{18,26-28)}を用いて培養液を送液している。このような構成は煩雑なチューブ接続を必要とするため、高い培養スループットを実現するのは難しい。さらには培養面積と比較してチューブ内のデッドボリュームが大きく、培養条件が制限される点も問題となる。これらの課題を解決するため、近年では、オンチップマイクロポンプを搭載したシステム^{18,26-28)}やマイクロマグネチックスターラーを用いた循環システムが開発された^{29,30)}。さらに、シンプルな送液システムとしてチップを傾けて重力駆動で培養液を送液するシステムに基づくMultiorgans-on-a-chipやBody-on-a-chipも報告されている^{21,26,31-34)}。これらの進歩の中でも複数臓器デバイスでマルチスループット化を実現している例はオンチップマイクロポンプを用いた、ごく限定された例のみの報告となっている^{35,36)}。

本稿では、筆者らが近年開発した圧力駆動型マルチスループットMPSについて紹介する。これは、マイクロプレートのように蓋を解放して培養液や細胞をチップに添加、回収できる構成となっているうえに、蓋をして専用の空圧アタッチメントに取り付けることで培養液の循環系をマルチスループットに構築できる構成となっており、生物系の研究者も使いこなせるユーザビリティを備えていると考える。

圧力駆動型の循環培養デバイス

一般的にマイクロ流体デバイスを用いた細胞培養は多数のチューブ接続やシリンジポンプによる送液を必要としており、生物系の研究者が使用するにはあまりにも複雑な装置構成となってしまう場合が多い。特に培養液を循環して培養する際には、外部のペリスタポンプを用いて送液する構成がしばしば採用されるが、無菌環境を維持しつつ装置をセットアップするのは容易ではなく、化合物評価系のように多種類の化合物をさまざまな濃度で評価するような培養系への適用は困難である。筆者らは

この課題を解決すべく、圧力駆動型の循環培養デバイスを開発してきた³⁷⁾。

図1に、血管内皮細胞にせん断応力を負荷して培養するために開発した圧力駆動型の循環培養デバイスを示す。循環培養デバイスは培地リザーバーと培養プレートによって構成されている(図1a, 図1b)。培地リザーバー内の送液リザーバーと回収リザーバーの底部において、これらのリザーバーが培養プレートに加工された培養流路と返送流路によって接続されている。各流路の出口側には循環方向の流れのみを許容する逆止弁が設置されている。これにより、回収リザーバーと送液リザーバーの気相部に交互に加圧することで、培養液を循環させることができる(図1c)。これまでに筆者らは、この圧力駆動型の循環培養デバイスを用いて血管内皮細胞にシェアストレスを負荷した状態で培養できることを示している。また、生理学的なシェアストレスを負荷することで血管内皮細胞を配向させることができ(図1d)、血管拡張や血液凝固阻害因子に関連した遺伝子の発現が向上することを確認している³⁷⁾。

マルチスループット Multiorgans-on-a-chip

マイクロ流体デバイスを用いた培養液循環の課題は複数臓器連結デバイス Multiorgans-on-a-chipにおいても

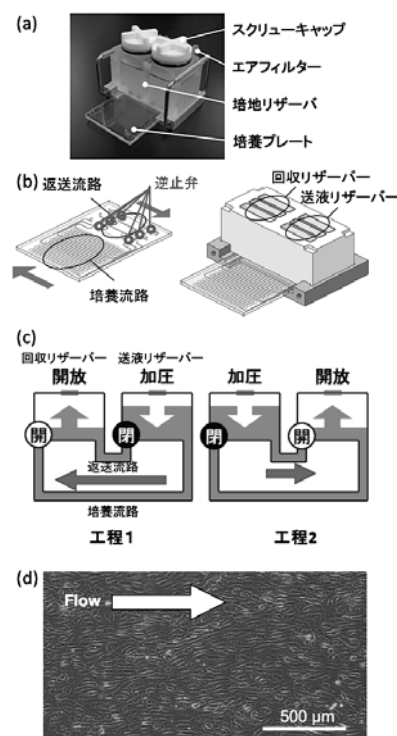


図1. 圧力駆動型マルチスループット循環培養デバイス³⁷⁾。(a) デバイスの外観。(b) デバイスの模式図。(c) 培養液循環の原理。(d) 血管内皮細胞の培養の様子。Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

共通の課題となる。そこで筆者らは、上述の圧力駆動型循環培養の原理を複数臓器連結デバイスに応用することで、圧力駆動型マルチスルーブット Multiorgans-on-a-chipを開発した(図2)³⁸⁾。このデバイスでは、異なる細胞が培養される複数の培養チャンバーの底部をマイクロ流路でつなぎ、培養チャンバー間で培養液を循環して培養するシステムとなっている(図2a)。細胞は培養チャンバー内の細胞培養ウェルにて培養される。マイクロ流路の出口側には、図1の循環培養システムと同様に培養液の逆流を防止する機構が備えられている。これにより、2つの培養チャンバーを交互に加圧することで培養液の循環を実現している。

図2bでは2臓器連結循環培養デバイスを8連で動作させる機構を示す。図2aの左端の写真に示すデバイスでは、培養チャンバーが4×4の配置で設置されており、この16個の培養チャンバーを2臓器×8連として用いることができる。圧力は培養デバイスの蓋部分に、気相部を連通するように加工された空圧配管を介して各チャンバーに分配され、8連の循環培養セットを同時に駆動できる構成となっている。細胞培養ウェルの培養面積は直径6 mmと市販の96ウェルプレートと同程度の面積に

設計されており、培養時に培養チャンバーに導入される培養液はチャンバーあたり300 μLと市販の96ウェルプレートでの培養系と比較してやや多い量となっている。

一方、加圧ラインの接続口にエアフィルターを配置することで培養空間の無菌性の管理も容易にできる構成となっている。この構成は、簡便なアタッチメントと組み合わせることで、MPSが誰でも取り扱えるほど簡便になり、ユーザビリティの観点からもMPSの普及を促進とする構成であると考えられる。図3に圧力駆動型マルチスルーブット Multiorgans-on-a-chipを用いた培養操作を示す。培養チャンバーおよび蓋はすべてオートクレーブにより滅菌可能な素材で加工されており、使用前にオートクレーブで滅菌ができる。クリーンベンチの中で培養チャンバーを組み立てた後、通常細胞培養に使用するようにマイクロピペットを用いて試薬や細胞、培地を添加することができる。クリーンベンチ内で蓋をした後、専用の接続ユニットを介して圧力制御装置に接続し、所定の繰り返し加圧の設定のもと、スタートボタンを押すと循環培養が開始される構成となっている。加圧および大気圧開放の際の空気の流出入は、滅菌済みのエアフィルターを介して行われるため、培養容器内の無菌環

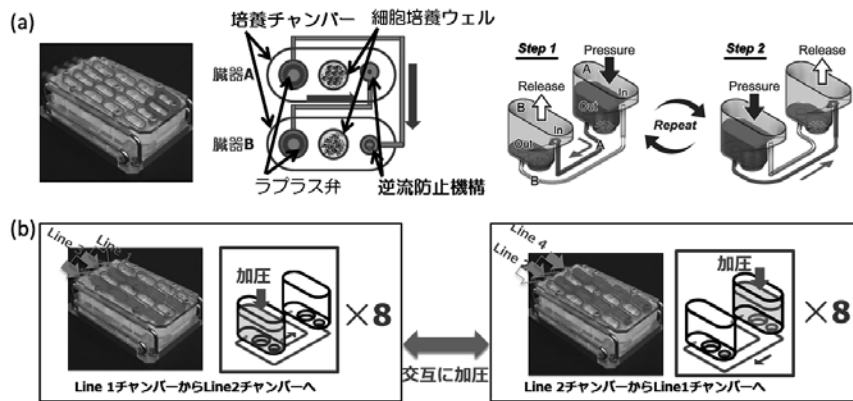


図2. 圧力駆動型マルチスルーブット Multiorgans-on-a-chip³⁸⁾. (a) 圧力駆動による培養液循環の原理, (b) 蓋に加工された空圧配管を利用したマルチスルーブット循環培養の機構. 2臓器8連の連結モデルを示す. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

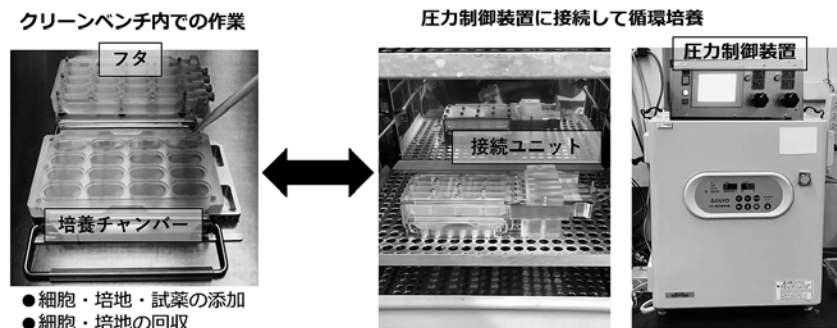


図3. 圧力駆動型マルチスルーブット Multiorgans-on-a-chipを用いた培養操作.

境は継続的に維持できる。循環培養の途中や終了した段階で、接続ユニットから切り離し、クリーンベンチ内に持ち込んで培養液を交換・サンプリングしたり、細胞を染色・回収したりすることも可能である。

プラットフォームとしてのマルチスループレット Micropysiological systems

上述のように、MPSには単臓器デバイスであるOrgans-on-a-chipおよび複数臓器連結デバイスであるMultiorgans-on-a-chipが含まれるが、MPSを産業化する際には、さまざまな臓器モデルに対応したMPSの製品化が求められる。この際に、用途や臓器種ごとに製品の数量差が発生し、製品によっては少量ロットのニーズしかない物も存在すると考えられる。筆者らは、この生産数量差に対応した製品開発を推進すべく、上述の圧力駆動マルチスループレットMultiorgans-on-a-chipをベースとしたプラットフォーム上でさまざまな臓器モデルの開発を進めている。この開発手法により、部品を共通化し、多品種の製品生産を効率的に進め、マルチスループレットMPSの用途拡大を実現したいと考えている(図4)。この際に、共通部品の蓋・培養チャンバー・ホルダーの製造には射出成型のような大量生産技術を用いて製造できる。そして、共通の外部圧力制御ユニットと接続することでさまざまなMPSを運用できる。図4に記載のマイクロ流路プレートとしては単臓器培養用や2臓器連結培養、4臓器連結培養用のプレートをユーザーのニーズに応じて選択して運用できる構成となっている。このプラットフォーム上で培養可能な臓器モデルとしては、一般的な単層培養系に加えて、セルカルチャーインサートを用いた腸管モデルや、マイクロウェルアレイを用いた肝スフェロイド培養系、上述のシェアストレス負荷培養系などが適用できる。

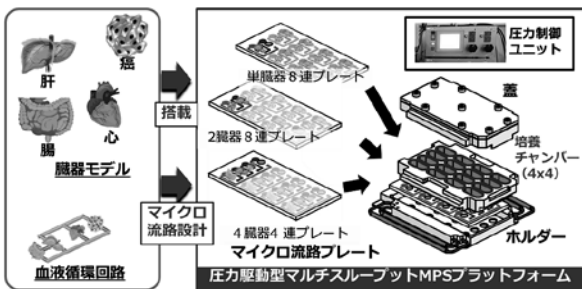


図4. 圧力駆動型マルチスループレットMPSプラットフォーム。共通部品によって構成されるプラットフォームに臓器モデル、培養液循環用マイクロ流路プレートを組み合わせて使用する構成。

マルチスループレット Multiorgans-on-a-chip を用いた 抗がん剤プロドラッグの評価

圧力駆動型マルチスループレットMultiorgans-on-a-chip上では、さまざまな細胞を用いた臓器モデルを連結して培養できる。図5に2臓器8連デバイスを用いた培養プロトコルの例を示す。上述のように、培養容器は培養面積や培地体積が96ウェルプレートに近い条件に設計されているため、96ウェルプレート用の一連の培地や培養プロトコル、アッセイプロトコルを参考に循環培養試験をデザインすることができる。2臓器8連デバイスでは、2つの培養チャンバーを1ユニットとして2臓器連結培養を行う。2つの培養チャンバーには異なる細胞を培養することができ、連結循環培養を開始する前にはそれぞれ異なる培地を使用して独立に培養することができる。図5aの例では、細胞Aを連結循環培養のX日前に播種して接着・前培養を行い、細胞Bを連結循環培養のY日前に播種して接着・前培養を行っている。Day 0において薬剤を含む培地に交換して、Z日間連結循環培養を行う。連結循環培養を行った後は培地や細胞を回収して解析したり、細胞を染色したりして評価することができる。培養チャンバーは4×4のアレイ状に配置されており、マイクロプレートの配置を検討すると同様に実験条件を設計できる。図5bの例では連結培養と独立培養の比較、薬剤有り無しとの条件の比較を1枚のデバイス上で行うような実験条件となっている。

筆者らはこれまでに圧力駆動型マルチスループレットMultiorgans-on-a-chipを用いて抗がん剤プロドラッグの肝代謝物のがん細胞に対する影響を評価できることを示している³⁸⁾。2臓器8連デバイスを用いて肝臓モデルとがんモデルを連結培養し、抗がん剤プロドラッグであ

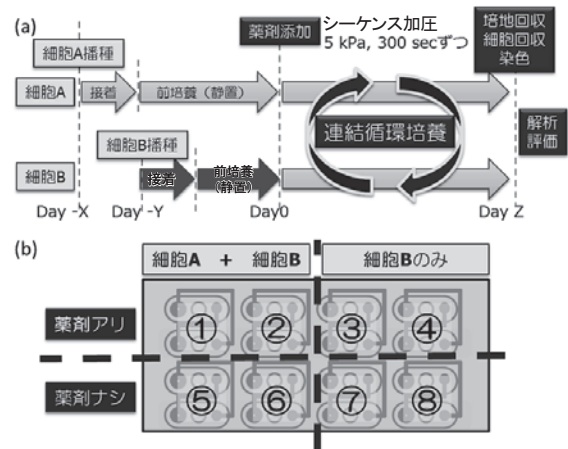


図5. 2臓器8連マルチスループレット Multiorgans-on-a-chip を用いた培養プロトコル設計。(a) 培養スケジュール例。(b) プレート配置例。

るカペシタビン (CAP) の影響評価を行った例を以下に示す。CAPは肝臓で代謝され、一次および二次代謝物の5'-deoxy-5-fluorocytidine (5'-DFCR) および5'-deoxy-5-fluorouridine (5'-DFUR) となり、これらががんに移行してがん細胞内で代謝されて5-fluorouracil (5-FU) となることで抗がん作用を発揮することが知られている³⁹⁾。肝臓のモデルとしてはヒト肝腫瘍由来細胞株HepaRGを用い、がんのモデルとしてはヒト大腸がん由来細胞株HCT 116を用いた。HepaRGは連結循環培養を開始する10日前より前培養を行い、HCT 116は連結循環培養を開始する1日前に播種して前培養を行った。前培養を行った後にCAPを添加して連結循環培養を3日間行った。図6aに連結循環培養を開始後3日目のHCT116の顕微鏡写真を示す。この時の細胞増殖を、Alamarblueを用いて定量した結果を図6bに示す。肝臓とがんの連結培養系に薬剤を添加した場合において顕著にHCT 116細胞の増殖が抑制され、がんのみの単独培養条件や薬剤を添加しない条件では増殖が抑制されることが確認された。これにより、2臓器8連デバイスを用いて、肝臓で代謝され、がんに作用する抗がん剤プロドラッグの影響を評価できることが確認された。また、培

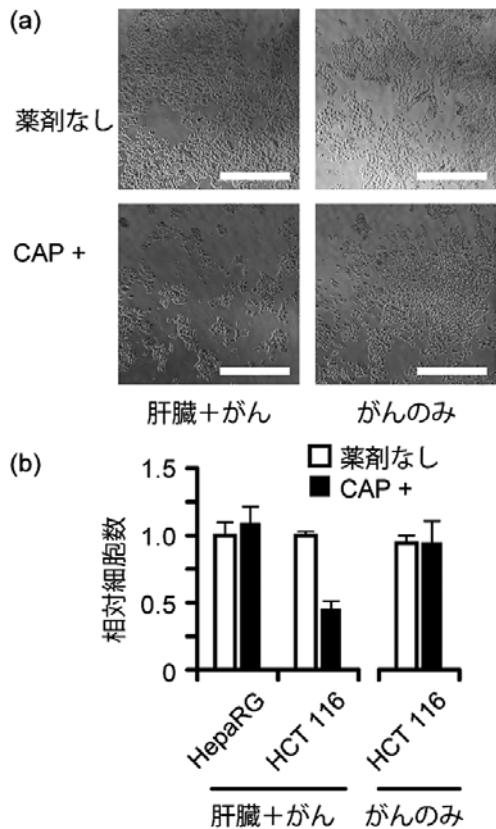


図6. 2臓器8連デバイスを用いたCAPの影響評価³⁸⁾。(a) 薬剤添加後3日目のHCT116の様子。(b) 細胞増殖の定量評価。Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

養液を回収して代謝物を定量することで、連結培養系において中間代謝物である5'-DFCRや5'-DFUR、最終代謝物である5-FUが生成していることが確認されている。また、細胞を回収して薬剤の代謝に関連する遺伝子発現を解析することができることも確認されている。

4臓器4連デバイスを用いた培養系の例を図7に示す³⁸⁾。この例では、腸、肝、がん、および正常細胞のモデルとしてそれぞれ大腸がん由来細胞Caco2、HepaRG、HCT116、および正常二倍体線維芽細胞TIG121を用いている。図7aに示す培養液循環回路にそって、培養液が循環する構成となっている。また、圧力駆動型マルチスルーポットMultiorgans-on-a-chipにはセルカルチャーインサートの加工品を挿入して使用できるようになっている(図7b)。このセルカルチャーインサート上にはCaco2細胞を播種して、腸管吸収を評価するモデルとして使用した。この4臓器4連の培養系を用いて、CAP、Tegafur (FT)、5-FUの3種類の抗がん剤を添加して細胞増殖を評価した結果を図8に示す。FTは肝臓で代謝されて5-FUに変換され、抗がん作用を発揮するプロドラッグである。結果としては5-FU、FT、CAPの順にがん細胞および正常細胞の増殖抑制効果が確認されている。また、4臓器連結デバイス上でのCAPの増殖抑制効果は2臓器8連デバイスで確認された効果より小さかったが、これは腸管吸収の影響や2臓器デバイスと4臓器デバイスの細胞数-培地体積比の違いなどが原因として2臓器連結デバイスと比較して4臓器連結デバイス上での細胞増殖抑制効果が小さくなったと考えられる。結果の解釈は議論のあるところであるが、4臓器連結デバイスにおいて、腸管吸収と肝代謝を連結して、抗がん剤のがんおよび正常細胞への影響を同時に評価可能であることが実証されている。

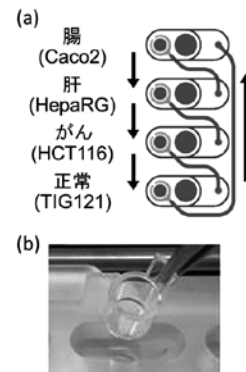


図7. 4臓器4連デバイスを用いた培養系。(a) 腸・肝・がん・正常細胞を連結した4臓器デバイスの培養液循環回路。(b) 腸管吸収評価に使用したセルカルチャーインサートの加工品。Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

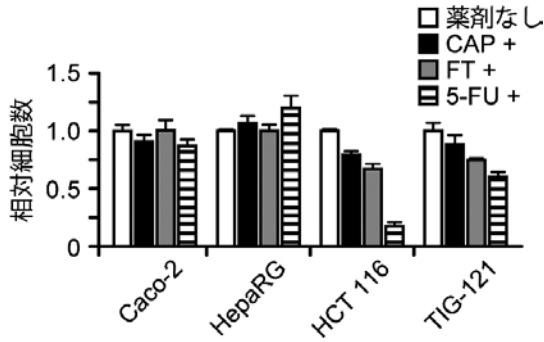


図8. 4臓器4連デバイスを用いた抗がん剤の影響評価³⁸⁾. 腸 (Caco2), 肝 (HepaRG), がん (HCT116), 正常細胞 (TIG121) の4臓器連結培養系において, CAP, FT, 5-FUの3種類の抗がん剤を添加して細胞増殖を評価した. Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry.

今後の展望

今後, 筆者らは「圧力駆動型マルチスルーポットMPSプラットフォーム」をベースとして, 各種臓器モデルの開発を進める予定である. 創薬ニーズに対応した臓器モデルの開発のためには, iPS細胞や初代培養細胞をはじめとした細胞ソースや, 生体の組織構造を反映した高次培養モデル, 培地, 培養プロトコルの開発が必要である. それぞれの分野の専門家と協力して関連技術開発を進めることで, 近い将来, ユーザーが目的に応じて自在に臓器/疾患モデルを選択し, 組み合わせ, 化学物質の評価系をデザインできる技術基盤が確立されると期待している.

謝 辞

本研究は産業技術総合研究所創薬基盤研究部門, バイオニクス研究センター, 幹細胞工学研究センター医薬品アッセイデバイス研究グループにて行われたものです. 金森敏幸グループ長はじめ, グループのメンバーの方々の協力なくしては成しえなかった成果であり, この場を借りて感謝申し上げます. 石田誠一先生 (国立医薬品食品衛生研究所) には研究を進めるうえでご助言頂き, 感謝申し上げます. また, 本研究を推進するにあたり, ご協力いただきましたエンジニアリングシステム株式会社, 第一三共株式会社, エーザイ株式会社の皆様に御礼申し上げます. また, 筆者を研究者への道へと導いていただき, 工学系研究者としての教育と志を与えてくださいました古崎新太郎先生 (東京大学工学系研究科名誉教授), 関実先生 (千葉大学・教授), 中嶋光敏先生 (筑波大学・教授), 市川創作先生 (筑波大学・教授) に感謝申し上げます. 学会でお世話になっております諸先生方や友人, 家族も含め, 多くの皆様のご助言やサポートによって本研究を遂行することができました. 本当にありがとうございました.

本研究の一部は文部科学省ナノテクノロジー総合支援プロジェクトの支援を受け, 産業技術総合研究所ナノプロセッシング施設にて行われたものです. また, 本研究の一部は科研費若手研究B, 科研費新学術領域公募研究, 第10回マンダム動物実験代替法国際研究助成金の助成を受けて実施されたものです.

- 1) Scannell, J. W., Blanckley, A., Boldon, H., and Warrington, B.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **11**, 191–200 (2012).
- 2) Pammolli, F., Magazzini, L., and Riccaboni, M.: *Nat. Rev. Drug Discov.*, **10**, 428–438 (2011).
- 3) Bhatia, S. N. and Ingber, D. E.: *Nat. Biotechnol.*, **32**, 760–772 (2014).
- 4) Chan, C. Y., Huang, P. -H., Guo, F., Ding, X., Kapur, V., Mai, J. D., Yuen, P. K., and Huang, T. J.: *Lab Chip*, **13**, 4697–4710 (2013).
- 5) Marx, U., Andersson, T. B., Bahinski, A., Beilmann, M., Beken, S., Cassee, F. R., Cirit, M., Daneshian, M., Fitzpatrick, S., Frey, O. and other authors: *Altex*, **33**, 272–321 (2016).
- 6) Huh, D., Matthews, B. D., Mammoto, A., Montoya-Zavala, M., Hsin, H. Y., and Ingber, D. E.: *Science*, **328**, 1662–1668 (2010).
- 7) Kim, H. J., Huh, D., Hamilton, G., and Ingber, D. E.: *Lab Chip*, **12**, 2165–2174 (2012).
- 8) Booth, R. and Kim, H.: *Lab Chip*, **12**, 1784–1792 (2012).
- 9) Jang, K. -J., Mehr, A. P., Hamilton, G. A., McPartlin, L. A., Chung, S., Suh, K. -Y., and Ingber, D. E.: *Integr. Biol.*, **5**, 1119–1129 (2013).
- 10) Miura, S., Sato, K., Kato-Negishi, M., Teshima, T., and Takeuchi, S.: *Nat. Commun.*, **6**, 8871 (2015).
- 11) Sung, J. H., Esch, M. B., Prot, J. -M., Long, C. J., Smith, A., Hickman, J. J., and Shuler, M. L.: *Lab Chip*, **13**, 1201–1212 (2013).
- 12) Shuler, M. L.: *Lab Chip*, **17**, 2345–2346 (2017).
- 13) Sweeney, L. M., Shuler, M. L., Babish, J. G., and Ghanem, A.: *Toxicol. In Vitro*, **9**, 307–316 (1995).
- 14) Shuler, M. L., Ghanem, A., Quick, D., Wong, M. C., and Miller, P.: *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 45–60 (1996).
- 15) Sin, A., Baxter, G. T., and Shuler, M. L.: *Proc. SPIE* 4560, pp. 98–101 (2001).
- 16) Sin, A., Chin, K. C., Jamil, M. F., Kostov, Y., Rao, G., and Shuler, M. L.: *Biotechnol. Prog.*, **20**, 338–345 (2004).
- 17) Fabre, K. M., Livingston, C., and Tagle, D. A.: *Exp. Biol. Med.*, **239**, 1073–1077 (2014).
- 18) Sung, J. H. and Shuler, M. L.: *Lab Chip*, **9**, 1385–1394 (2009).
- 19) Li, Z. Y., Guo, Y. Q., Yu, Y., Xu, C., Xu, H., and Qin, J. H.: *Integr. Biol.*, **8**, 1022–1029 (2016).
- 20) Jie, M. S., Li, H. F., Lin, L. Y., Zhang, J., and Lin, J. M.: *Rsc Adv*, **6**, 54564–54572 (2016).
- 21) Oleaga, C., Bernabini, C., Smith, A. S. T., Srinivasan, B., Jackson, M., McLamb, W., Platt, V., Bridges, R., Cai, Y., Santhanam, N. and other authors: *Sci. Rep.*, **6**, 20030 (2016).
- 22) Vernetti, L., Gough, A., Baetz, N., Blutt, S., Broughman, J. R., Brown, J. A., Foulke-Abel, J., Hasan, N., In, J., Kelly, E. and other authors: *Sci. Rep.*, **7**, 42296 (2017).
- 23) Chen, W. L. K., Edington, C., Suter, E., Yu, J., Velazquez, J. J., Velazquez, J. G., Shockley, M., Large, E. M., Venkataramanan, R., Hughes, D. J. and other authors: *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 2648–2659 (2017).
- 24) Zhang, B. and Radisic, M.: *Lab Chip*, **17**, 2395–2420

- (2017).
- 25) Imura, Y., Sato, K., and Yoshimura, E.: *Anal. Chem.*, **82**, 9983–9988 (2010).
 - 26) Sung, J. H., Kam, C., and Shuler, M. L.: *Lab Chip*, **10**, 446–455 (2010).
 - 27) Zhang, C., Zhao, Z. Q., Rahim, N. A. A., van Noort, D., and Yu, H.: *Lab Chip*, **9**, 3185–3192 (2009).
 - 28) Prot, J. M., Maciel, L., Bricks, T., Merlier, F., Cotton, J., Paullier, P., Bois, F. Y., and Leclerc, E.: *Biotechnol. Bioeng.*, **111**, 2027–2040 (2014).
 - 29) Nakayama, H., Kimura, H., Komori, K., Fujii, T., and Sakai, Y.: *J. Robot. Mechatron.*, **19**, 544–549 (2007).
 - 30) Nakayama, H., Kimura, H., Fujii, T., and Sakai, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **117**, 756–762 (2014).
 - 31) Esch, M. B., Ueno, H., Applegate, D. R., and Shuler, M. L.: *Lab Chip*, **16**, 2719–2729 (2016).
 - 32) Miller, P. G. and Shuler, M. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **113**, 2213–2227 (2016).
 - 33) Lee, H., Kim, D. S., Ha, S. K., Choi, I., Lee, J. M., and Sung, J. H.: *Biotechnol. Bioeng.*, **114**, 432–443 (2017).
 - 34) Choe, A., Ha, S. K., Choi, I., Choi, N., and Sung, J. H.: *Biomed. Microdevices*, **19**, 4 (2017).
 - 35) Wagner, I., Materne, E. M., Brincker, S., Sussbier, U., Fradrich, C., Busek, M., Sonntag, F., Sakharov, D. A., Trushkin, E. V., Tonevitsky, A. G., Lauster, R., and Marx, U.: *Lab Chip*, **13**, 3538–3547 (2013).
 - 36) Coppeta, J. R., Mescher, M. J., Isenberg, B. C., Spencer, A. J., Kim, E. S., Lever, A. R., Mulhern, T. J., Prantl-Baun, R., Comolli, J. C., and Borenstein, J. T.: *Lab Chip*, **17**, 134–144 (2017).
 - 37) Satoh, T., Narazaki, G., Sugita, R., Kobayashi, H., Sugiura, S., and Kanamori, T.: *Lab Chip*, **16**, 2339–2348 (2016).
 - 38) Satoh, T., Sugiura, S., Shin, K., Onuki-Nagasaki, R., Ishida, S., Kikuchi, K., Kakiki, M., and Kanamori, T.: *Lab Chip*, **18**, 115–125 (2017).
 - 39) Walko, C. M. and Lindley, C.: *Clin. Ther.*, **27**, 23–44 (2005).