

平成 30 年度 博士論文



# Zonation を実現する肝細胞培養システムの開発

指導教員 藤井 輝夫 教授

東京大学 工学系研究科 精密工学専攻

学生証番号 37-167047

松本 倫実



---

# 目次

第 1 章	序論	1
1.1	背景	2
1.1.1	新薬開発における問題点	2
1.1.2	肝細胞培養の意義	3
1.1.3	肝細胞を用いた既存の <i>in vitro</i> 試験方法	4
1.1.4	<i>In vivo</i> における肝細胞の代謝機能と liver zonation	4
1.1.5	酸素濃度の変換	6
1.2	研究目的	8
1.3	関連研究に対する本研究の位置づけ	9
1.4	本論文の構成	13
第 2 章	生体内環境を模倣するマイクロ流体システムの提案	15
2.1	緒言	16
2.2	マイクロ流体システムの利点	17
2.2.1	既存の肝細胞培養技術	17
2.2.2	マイクロ流体システムによる微小環境の制御	18
2.2.3	Organ on a chip	20
2.2.4	Liver on a chip	21
2.2.5	酸素濃度を考慮したマイクロ流体デバイス	22
2.2.6	酸素濃度を考慮した肝細胞培養系の現状と問題点	25
2.3	肝代謝機能の主な評価方法	31
2.3.1	免疫染色	31
2.3.2	Western blotting および PCR 法	31
2.3.3	酸素濃度勾配条件下での肝代謝機能の測定に適した評価方法	34
2.4	Zonation を再現する <i>in vitro</i> 培養システムの提案	39
2.4.1	本研究における <i>in vitro</i> 培養システムの設計要件	39

---

2.4.2	免疫染色用デバイス・RT-qPCR 用デバイス両者に共通するコンセプト	40
2.4.3	RT-qPCR 用デバイスにのみ必要な設計要件	42
2.5	結言	44
<b>第 3 章</b>	<b>デバイス内酸素濃度の制御方法と計測方法</b>	<b>45</b>
3.1	緒言	47
3.2	濃度一定の酸素を送り込むシステム	48
3.2.1	バブリングシステム	48
3.2.2	酸素濃度制御型マイクロ流体デバイス	48
3.3	酸素濃度制御システムの機能評価	51
3.3.1	培養液流入時の酸素濃度制御システム	51
3.3.2	実験目的	51
3.3.3	実験環境・実験手順	52
3.3.4	結果・考察	53
3.4	酸素濃度計測方法	57
3.4.1	電気化学的方法	57
3.4.2	蛍光測定方法と酸素感応性蛍光材料	57
3.4.3	酸素感応性蛍光材料の蛍光原理	58
3.4.4	蛍光測定用センサの種類	59
3.4.5	短所・長所をふまえた各センサに関する考察	62
3.5	デバイス内における酸素濃度勾配の計測方法の検討	65
3.5.1	酸素感応性蛍光材料の種類	65
3.5.2	蛍光層のポリマーのガス透過性が酸素感応性蛍光材料の反応に与える影響の検証	66
3.6	酸素濃度一定条件におけるデバイス内酸素センサの蛍光強度とその分布の評価	67
3.6.1	実験目的	67
3.6.2	提案手法	67
3.6.3	実験環境・実験手順	67
3.6.4	結果・考察	67
3.7	結言	70
<b>第 4 章</b>	<b>Zonation 再現のための肝細胞培養デバイスシステムの開発および機能評価</b>	<b>71</b>
4.1	緒言	73
4.2	肝細胞培養システムの製作	74

4.2.1	肝細胞培養デバイス	74
4.2.2	PDMS 製流路の成形	77
4.3	HepG2 を用いた培養実験による免疫染色用デバイスシステムの機能評価	85
4.3.1	実験目的	85
4.3.2	酸素センサに含まれる PtOEP の毒性試験	85
4.3.3	HepG2 の灌流培養	85
4.3.4	デバイス内細胞染色方法と細胞数の計算方法	86
4.3.5	使用した顕微鏡および画像処理方法	86
4.3.6	使用したセンサの空間分解能及びシグナル分解度	86
4.3.7	層流と酸素拡散に関するマルチフィジックス解析	87
4.3.8	結果・考察	88
4.4	蛍光色素を用いた RT-qPCR 用デバイスシステムの機能評価	94
4.4.1	実験目的	94
4.4.2	シースフローとリエージェントフローの可視化	94
4.4.3	Trypsin 用 Inlet の直径とリエージェントフローの関係の検証	94
4.4.4	流れと拡散に関するマルチフィジックス解析	95
4.4.5	結果・考察	95
4.5	HepG2 を用いた培養実験による PCR 用デバイスシステムの機能評価	99
4.5.1	HepG2 の局所的蛍光染色	99
4.5.2	細胞の局所的回収および、回収した細胞の RT-qPCR	99
4.5.3	結果・考察	100
4.6	結言	105
第 5 章	Rat 初代培養肝細胞培養実験	107
5.1	緒言	108
5.2	Rat 初代培養肝細胞を用いた免疫染色実験	109
5.2.1	実験目的	109
5.2.2	Rat 初代培養肝細胞の単離とデバイス内培養	109
5.2.3	タンパク質の免疫染色	109
5.2.4	使用した顕微鏡および画像処理方法	111
5.3	結果・考察	113
5.3.1	Rat 初代培養肝細胞を培養した場合のデバイス内酸素濃度勾配	113
5.3.2	免疫染色結果	114
5.4	結言	119

---

第 6 章	Rat 初代培養肝細胞に対する Phenacetin を用いた毒性試験	121
6.1	緒言 .....	122
6.2	実験目的 .....	123
6.3	Phenacetin を含む培養液を用いた Rat 初代培養肝細胞の灌流培養 .....	123
6.4	コントロール条件としての, Phenacetin を含む培養液を用いた Rat 初代培養肝細胞の静置培養 .....	124
6.5	DCFDA による ROS の可視化 .....	124
6.6	使用した顕微鏡および画像処理方法 .....	125
6.7	結果・考察 .....	126
6.7.1	DCFDA による ROS の可視化 .....	126
6.7.2	免疫染色結果 .....	127
6.8	結言 .....	131
第 7 章	考察	133
7.1	緒言 .....	134
7.2	考察 .....	135
7.3	結言 .....	139
第 8 章	結論	141
8.1	本研究のまとめ .....	142
8.2	今後の展望 .....	145
参考文献		151
研究業績		165

---

# 目次

1.1	新薬開発の流れと現状. ....	2
1.2	ヒト肝臓内部の環境. ....	6
1.3	酸素濃度勾配と肝代謝および発現する遺伝子の関係 [Monga 2011]. ....	7
1.4	zonation を実現するための肝細胞培養デバイスシステムのコンセプト ....	12
1.5	各章の関係. ....	14
2.1	肝細胞のスフェロイド培養. a:細胞播種から 1 時間後, b:1 日後, c:2 日後, d:5 日後 [Landry 1985]. ....	18
2.2	肝細胞のコラーゲンサンドイッチ培養. A:コラーゲンで細胞を挟み込む前, B:コラーゲンで細胞を挟み込んだ直後, C:12 時間後, D:48 時間後, E:7 日後 [Berthiaume 1996]. ....	19
2.3	各流路において, 小分子化合物の濃度を少しずつ変化させることのできる細胞培養流路 [Frank 2013]. ....	20
2.4	各 Organ on a chip と Body on a chip [Huh 2012]. ....	21
2.5	マイクロ流体デバイスを用いた灌流培養システム [Leclerc 2003]. ....	22
2.6	毛細血管と血管内皮細胞を模擬した培養デバイス [Lee 2007]. ....	23
2.7	肝細胞の配列を考慮し血管内皮細胞を模擬した培養デバイス [Nakao 2011]. ....	23
2.8	段差を用いてせん断応力を軽減した培養デバイス [Leclerc 2003]. ....	24
2.9	多孔膜を折ることで帯状構造を再現したデバイス [Liu 2016]. ....	24
2.10	脱酸素溶液により酸素濃度勾配を形成可能な緑膿菌培養デバイス. A:デバイス構造, B:培養用流を黄, 脱酸素溶液用流路を青で染色したデバイス [Skolimowski 2010]. ....	26
2.11	酸素濃度勾配を実装した lung on a chip. a:デバイス構造, b:デバイス写真, c: 流路断面図と酸素濃度勾配形成の仕組み [Chen 2011]. ....	27
2.12	酸素ガスの灌流による酸素濃度勾配形成デバイス. a:酸素ガス灌流用流路の構造, b:デバイス構造, c:デバイス全体像 [Mauleon 2012]. ....	28

2.13	デバイス内で肝細胞の呼吸により酸素濃度勾配を形成する肝細胞培養デバイス [Allen 2002].	29
2.14	酸素ガス用チャンネルを用いて酸素濃度勾配を形成する肝細胞培養デバイス [Sato 2014].	29
2.15	肝臓内での尿素合成およびアンモニアの代謝経路	30
2.16	Calcein による生細胞の免疫染色結果. [佐能 2015]	32
2.17	電気泳動法による高酸素条件と低酸素条件での遺伝子発現量における差の検出. [Allen 2002].	33
2.18	PCR 法による肝細胞の遺伝子発現測定結果. [Baudoin 2014]	34
2.19	Y 字流路により層流を用いて細胞を局所的に回収するデバイス構造. A: デバイス構造, B: デバイス外観. [Villa-Diaz 2009]	35
2.20	トリプシンによる局所的細胞回収のタイムラプスによる観察結果. [Villa-Diaz 2009]	36
2.21	上下方向の拡散を利用して細胞を回収可能なデバイス構造. A: デバイス層構造, B: デバイス断面図と平面図. [Kraus 2006]	37
2.22	培養液の流量と試薬の流れの関係. A: デバイス上部から観察した場合の各流量条件における試薬の拡散の様子, B: 試薬流量 1 $\mu\text{L}/\text{min}$ , 培養液流量 60 $\mu\text{L}/\text{min}$ 条件において蛍光試薬を流した場合の蛍光輝度, C: 培養液流量 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ 条件 (上) と 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ 条件 (下) での細胞染色比較. [Kraus 2006]	38
2.23	免疫染色用デバイスのデザイン.	41
2.24	酸素濃度勾配下で培養した肝細胞について, 局所的に細胞を回収し PCR 解析をするコンセプト.	42
2.25	局所的細胞回収が可能な PCR 用デバイス. a: デバイス構造の概略図. b: 局所的細胞回収の手順と仕組み.	43
3.1	バブリングにより溶存酸素が調整される仕組み.	49
3.2	酸素濃度制御型マイクロ流体デバイスの流路構造. [Funamoto 2012]	49
3.3	酸素濃度制御型マイクロ流体デバイスによる酸素濃度制御結果. [Funamoto 2012]	50
3.4	提案手法.	51
3.5	実験方法.	52
3.6	使用した蛍光式酸素センサ. センサ内に溶液を流している状態で酸素濃度を測定する.	53
3.7	実験環境.	54



3.8	シリコンチューブの長さや瓶の中を通過した酸素濃度の関係.	55
3.9	シリコンチューブの長さや瓶の中を通過した後の酸素濃度の減少量の関係.	56
3.10	蛍光色素の蛍光原理.	59
3.11	蛍光測定方法の種類 [Oomen 2016].	60
3.12	培養時間経過と酸素消費に反応する PtOEP [Montagne 2009].	61
3.13	ファイバペア型蛍光センサをマイクロ流体デバイスに組み込んだ例 [Kimura 2008].	62
3.14	ファイバペア型蛍光センサを組み込むことのできるマイクロ流体デバイスの外観 [Kimura 2008].	63
3.15	RTDP により酸素濃度を測定するデバイス [Mehta 2007]. A: デバイスの層構造, B: デバイス外観, C: 細胞培養流路とポンプの位置.	64
3.16	0% 酸素濃度溶液を滴下した場合の PtOEP を混合した PS 層の蛍光反応.	66
3.17	蛍光輝度評価実験セットアップ.	68
3.18	酸素濃度と輝度の関係.	69
4.1	鋳型の作製手順.	76
4.2	高さ約 100 mm の流路の鋳型を作成する際のフォトレジストのスピンコート条件.	76
4.3	高さ約 300 mm の流路の鋳型を作成する際のフォトレジストのスピンコート条件.	77
4.4	作製した鋳型の寸法.	78
4.5	三次元構造化を施した場合のデバイス予定図.	78
4.6	PDMS の成形手順.	79
4.7	PS 層のスピンコート条件.	80
4.8	デバイスの各層の接合順と接合方法.	81
4.9	流入口, 流出口に接合するチューブの構造.	82
4.10	デバイス外観.	83
4.11	作製したデバイスと流路の構造および寸法. a: デバイスの層構造, b: 流路の形状, c: 流路断面図.	83
4.12	PCR 用デバイスの構造・寸法および外観. a: デバイスの層構造. b: デバイスの表面図. c: 細胞培養用流路および細胞回収用流路の寸法詳細. d: 細胞培養用流路および細胞回収用流路の高さ. e: デバイス外観.	84
4.13	デバイス内の HepG2 の様子. a: 灌流培養開始前 (播種 6 時間後) の細胞の様子. b: 2 時間の灌流培養後 (実験終了時) の細胞の様子.	90

4.14	HepG2 培養実験結果. a: PKH67 による細胞膜染色結果. b: 灌流培養後の酸素センサフィルムの蛍光画像. c: デバイス内酸素濃度分布 (スケールバー: 2 mm). . . . .	91
4.15	デバイス内酸素濃度勾配の評価 (n=5). a: 酸素濃度勾配の測定方法. b: 灌流する培養液の流量変化に伴う酸素濃度勾配の変化. . . . .	91
4.16	細胞呼吸が各値の場合においての, デバイス内に形成される酸素濃度分布の 2 次元シミュレーション結果. 細胞呼吸の値は a: $1.0 \times 10^{-6}$ mol/s/cell, b: $6.0 \times 10^{-7}$ mol/s/cell, c: $1.5 \times 10^{-7}$ mol/s/cell. . . . .	92
4.17	細胞呼吸が各値の場合においての, デバイス内に形成される酸素濃度勾配のシミュレーション結果. 細胞呼吸の値は a: $1.0 \times 10^{-6}$ mol/s/cell, b: $6.0 \times 10^{-7}$ mol/s/cell, c: $1.5 \times 10^{-7}$ mol/s/cell. . . . .	93
4.18	本デバイス内で形成される各流れの可視化. a: Rhodamine によるシーフローの可視化. b: Fluorescein によるリエージェントフローの可視化. . . . .	96
4.19	細胞回収用流路を中央のみ使用した場合の, リエージェントフローの幅 (流れ幅). a: シミュレーション結果. b: 実験結果. Trypsin 流れは Fluorescein により可視化されている. c: シミュレーション結果と実験結果の比較 (n=3). . . . .	97
4.20	細胞回収用流路を 3 本同時に使用した場合の, Trypsin 流れ幅. a: シミュレーション結果. b: 実験結果. Trypsin 流れは Fluorescein により可視化されている. c: シミュレーション結果と実験結果の比較 (n=3). . . . .	98
4.21	細胞回収用流路に PKH67 を流した場合の細胞染色結果. . . . .	101
4.22	細胞回収前の細胞培養流路全体の様子. a: 細胞培養用流路の明視野画像. b: デバイス底面の酸素センサフィルムにより, 細胞培養用流路の酸素濃度分布を表した蛍光画像. . . . .	102
4.23	局所的細胞回収実験結果. a: デバイス 1 から採集した細胞に関する RT-qPCR 結果. b: デバイス 2 から採集した細胞に関する RT-qPCR 結果. . . . .	103
4.24	局所的細胞回収実験前後の明視野画像の比較. a: 細胞回収前の細胞回収用流路付近の明視野画像. b: 細胞回収後の細胞回収用流路付近の明視野画像. . . . .	104
4.25	回収した細胞の PCR 結果. . . . .	104
5.1	画像処理方法. a:核染色画像の 2 値化. b: 免疫染色画像のノイズの除去. . . . .	112
5.2	Rat 初代培養肝細胞の培養時に, 各流量において 30 分で形成されたデバイス内酸素濃度分布 (スケールバー: 2 mm). . . . .	113

---

5.3	Rat 初代培養肝細胞の培養時に，各流量において 30 分で形成されたデバイス内酸素濃度勾配 (n=3)．	114
5.4	Rat 初代培養肝細胞の培養時に形成されたデバイス内酸素濃度勾配の時間経過 (n=3)．	114
5.5	1 日間培養後の，デバイス内酸素濃度分布と上流および下流における各タンパク質の発現を表す蛍光画像 (スケールバー：200 $\mu\text{m}$ )．	116
5.6	1 日間培養後の各タンパク質の発現結果の比較．	117
5.7	2 日間培養後の，デバイス上流と下流における CYP3A2 および betacatenin の免疫染色結果の比較 (スケールバー：200 $\mu\text{m}$ )．	118
6.1	Phenacetin の肝臓内での代謝経路．	123
6.2	96 ウェルプレートを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各酸素濃度条件での細胞の明視野画像 (スケールバー：200 $\mu\text{m}$ )．	127
6.3	96 ウェルプレートを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各酸素濃度条件での ROS (活性酸素) 染色結果 (スケールバー：2 mm)．	128
6.4	開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各酸素濃度条件での酸素センサの蛍光画像 (a,c) と ROS (活性酸素) 染色結果 (b,d)． a,b: Phenacetin 投与無し， c,d: Phenacetin 投与有り．	128
6.5	開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各酸素濃度条件での細胞の明視野画像 (スケールバー：200 $\mu\text{m}$ )． 上段が Phenacetin 投与無し， 下段が Phenacetin 投与有り．	129
6.6	開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各デバイス上流 (高酸素領域) の免疫染色結果． 上段が Phenacetin 投与無し， 下段が Phenacetin 投与有り (スケールバー：200 $\mu\text{m}$ )．	129
6.7	開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各デバイス下流 (低酸素領域) の免疫染色結果． 上段が Phenacetin 投与無し， 下段が Phenacetin 投与有り (スケールバー：200 $\mu\text{m}$ )．	130



---

# 表目次

1.1	新薬開発の各段階においてかかる年数と費用 [八木 2010].	3
1.2	現在行われている肝細胞を用いた <i>in vitro</i> 試験方法一覧とその課題.	5
1.3	各酸素濃度において発現する肝細胞の機能.	6
1.4	37 °Cにおける酸素濃度の単位変換表.	7
3.1	細胞培養系で過去に使用された酸素感応性蛍光材料一覧. [Skolimowski 2010]	58
3.2	各センサの長所と短所一覧.	64
4.1	肝細胞培養条件.	89
4.2	各流量で培養液を流した際の, デバイス中心部の培養液の流速と細胞にかかるせん断応力.	90
4.3	実験およびシミュレーションで得られた酸素濃度勾配.	92
4.4	3本の細胞回収用流路に同時に形成したリエージェントフロー(Fluorescein)の流れ幅計測結果 (n=3).	98
4.5	3本の細胞回収用流路に同時に形成したリエージェントフロー(Fluorescein)の輝度計測結果 (n=3).	98
5.1	代謝に関係するタンパク質について, それぞれの発現領域と関連する肝代謝機能.	110
5.2	使用した1次抗体一覧.	110
5.3	使用した2次抗体一覧.	111
6.1	各インキュベータで設定した酸素濃度と, 実際にその中に設置した96ウェルプレートでRat初代培養肝細胞を培養した場合のD2におけるウェル底面の酸素濃度の関係.	126



# 第 1 章

## 序論

---

1.1	背景 .....	2
1.1.1	新薬開発における問題点 .....	2
1.1.2	肝細胞培養の意義 .....	3
1.1.3	肝細胞を用いた既存の <i>in vitro</i> 試験方法 .....	4
1.1.4	<i>In vivo</i> における肝細胞の代謝機能と liver zonation .....	4
1.1.5	酸素濃度の変換.....	6
1.2	研究目的 .....	8
1.3	関連研究に対する本研究の位置づけ.....	9
1.4	本論文の構成 .....	13

---

## 1.1 背景

### 1.1.1 新薬開発における問題点

現在では、1種類の新薬開発に対し10～15年という長い年月と数十億円から数百億円という莫大な研究開発費がかけられている。新薬開発の流れを図1.1に、各フェーズにかかる平均的な時間と費用を表1.1に示す[八木2010]。新薬候補の化学物質は、非臨床試験のうち、ヒトに対する臨床試験を経てヒトに対する効能と安全性が明らかになって初めて新薬となる。臨床試験は、少数の健康な成人を対象とした「第Ⅰ相試験」、少数の患者を対象とした「第Ⅱ相試験」、多数の患者を対象として既存薬や偽薬（プラシーボ効果）との比較を含めた大規模な試験を行う「第Ⅲ相試験」の三段階を経て行われるが、その臨床試験に約5年の年月が費やされる。対して、非臨床試験には約3年費やされること、臨床試験の各段階よりも長期間取り組まれることがわかっている[八木2010]。また、平均で非臨床試験に約13億円、臨床試験に55億円前後の費用がかけられている。このように、莫大な開発費と時間は主に非臨床試験と臨床試験に費やされるが、それはヒトに対する新薬の安全性を十分に検証するためである。

非臨床試験では主に動物実験が行われるが、動物実験を通過してもヒトに対する治験

新薬開発の流れ

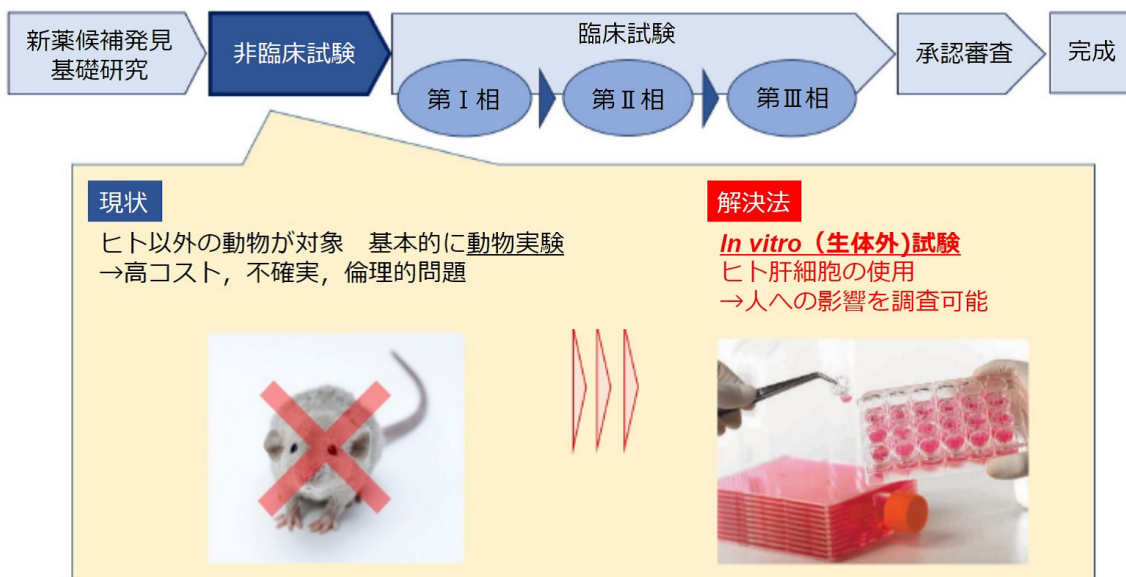


図 1.1 新薬開発の流れと現状.



表 1.1 新薬開発の各段階においてかかる年数と費用 [八木 2010].

評価項目	臨床試験				申請・承認	計
	非臨床試験	第 I 相	第 II 相	第 III 相		
開発期間 (ヶ月)	29.0	15.0	15.0	25.0	26.0	110.0
開発費用 (百万円)	1,310.6	1,086.0	2,110.1	4,018.2	349.2	8,874.1

で異常が見つかることが大半であり、新薬開発の成功率は非常に低い。臨床試験第 I 相を通過する新薬候補物質は、動物実験にを通過したものの約 30% と考えられているが [Sena 2010], 失敗例は主に発表されない慣習から、実際は 8% 未満であるという報告もある [Hackam 2006][Mac 2014]. その原因の一つに、動物実験ではヒト以外の動物の肝臓における薬物代謝を調査することはできるが、ヒト以外の動物の肝臓では分解・解毒が可能でヒトの肝臓では分解・解毒が不可能な薬を判別できないことが挙げられる。さらに、表 1.1 の開発費用欄に示すように、臨床試験第 I 相にかかる費用が約 11 億円であるのに対し、非臨床試験すなわち動物実験にかかる費用が約 13 億円である。このように、動物実験は不確実性が高いにもかかわらず、臨床試験第 I 相と同程度以上の大きな費用のかかる手法である。また、動物実験は倫理的問題もあることから、2007 年に EU で実施された REACH 法により規制傾向にあり、世界中で動物実験の代替法の開発が重要視されている [Baudoin 2014].

### 1.1.2 肝細胞培養の意義

*In vitro* 試験には一般に培養細胞が用いられるが、そのためには、生体内から取り出された細胞や株化された細胞を生体外で生育させる操作、すなわち細胞培養操作が必要である。細胞培養で得られた細胞は、生体内で見られる現象や反応を生体外の実験系で理解するためのツールとして、新規生理活性物質のスクリーニングや医薬開発以外にも、生物学をはじめとし、環境化学物質の生体への影響調査等に用いられている。さらに、近年では再生医療や人工臓器に関する研究が盛んにおこなわれており、これらの分野では培養細胞そのものが価値を持つ生産物として利用されている [高木 2007].

様々な種類の細胞に関して研究が進められる中で、肝細胞を培養することは重要な意義を持つ。肝臓は生体恒常性を保つための重要な多機能性の臓器であり、500 以上の機能を司るとされている。肝臓の機能は、代謝、解毒、胆汁の生成の 3 種類に分類でき、代謝に関しては主に腸から吸収した糖からグリコーゲン合成して体内で貯蔵し、必要な時に再度グリコーゲンから糖を合成して全身へ供給する働きを持つ。解毒に関しては、アルコールや老廃物などの人体にとって有害な物質を分解、無毒化し、中心静脈より排泄する。この

とき、コレステロールが排泄の過程で一部胆汁酸と複合体を形成することで胆汁が生成される [Jungermann 1996]. 肝臓の持つこれらの機能を、培養細胞を用いた生体外の実験系で簡便に評価することが出来れば、生物学的な現象の理解や解明につながる [Matsuura 2010]. また、肝臓における化学物質の代謝や排泄を培養細胞で試験することが出来れば、創薬の分野におけるドラッグスクリーニングや薬物動態の解明に大きく貢献することが出来る [Behnia 2000]. さらに、これらの機能を維持した細胞を培養によって得ることが出来れば肝移植にとって代わるような再生医療や人工臓器開発への応用が期待できる.

### 1.1.3 肝細胞を用いた既存の *in vitro* 試験方法

経口薬は食べ物から得られる養分と同様に、腸で吸収されたのち門脈を経て肝臓で代謝されてから全身に回ると考えられている. 経口薬の人体への安全性は、肝臓による薬の分解や解毒が可能かどうか大きく起因し、経口薬の効能を確認するためには、肝臓で代謝されたのちに効能を保持できているかを調べることが重要である. そのため、ヒト肝臓のスライス片や摘出したヒト肝細胞と薬を *in vitro* で混合する方法が開発されてきた [Sivaraman 2005]. これらの *in vitro* 試験方法の利点と欠点を表 1.2 に示す. 株化された細胞は最も扱いやすいが、生体内 (*in vivo*) の肝細胞と表現型が異なるため機能が低下しており、これを用いて *in vivo* と同条件の肝機能を再現することは不可能であると考えられる [Yu 2001]. また、*in vivo* から採取した細胞や肝臓片を用いた場合は実験開始直後は肝機能が持続するが、持続時間は短く 2~4 時間ほどである [Powell 1989][Berry 1997][Bhatia 1999][Lerche-Langrand 2000]. どの方法においても、肝臓の多機能性を十分に長時間再現したものは報告がない [Sivaraman 2005]. 加えて、現在行われている *in vitro* 試験を通過した中で臨床試験第 I 相を通過する新薬候補物質は 8% 未満であることが知られており、*in vitro* 試験方法の更なる改善が求められている [Tornell 2002][八木 2010].

### 1.1.4 *In vivo* における肝細胞の代謝機能と liver zonation

*In vitro* で生体内 (*in vivo*) における肝臓の環境を再現するのが困難である理由として、肝細胞が複数の機能を有しており、それを一定のバランスで同時に再現することが *in vitro* の培養系では難しいことが挙げられる. ヒト肝臓において肝細胞を取り巻く環境を図 1.2 に示す. 肝臓内で、肝細胞は肝小葉と呼ばれる六角形の小葉構造を成し、その集合体で肝臓が構成されている. 肝小葉内で肝細胞は带状構造をとり、この構造により細胞極性が生じている. 細胞極性のない肝細胞は肝機能が極めて弱くなることから、細胞極性が生じる一因であるこの带状構造は肝機能の発現に関わっていると考えられている. 肝小葉の半径は 0.5~

表 1.2 現在行われている肝細胞を用いた *in vitro* 試験方法一覧とその課題.

試験方法	長所	短所
肝臓（臓器）の使用 [Powell 1989]	既存の方法で一番 <i>in vivo</i> に近い反応が観察可能	ハイスルーブットでない 肝機能持続が <b>1~2時間</b>
肝臓の組織片 [Lerche-Langrand 2000]	微小胆管を含め <i>in vivo</i> における組織形態が機能する	肝機能持続が <b>最高10時間</b> 死細胞が多く混入 →生細胞への影響
生体内から採取した直後の肝細胞 [Berry 1997]	ハイスルーブット 採取場所ごとの比較が可能	細胞極性を持たない →遺伝子発現が弱い 肝機能持続が <b>2時間程度</b> 微小胆管を再現できない
初代培養肝細胞 [Bhatia 1999]	ハイスルーブット 細胞の状態が安定している	肝機能を再現できない場合が多い 微小胆管を再現できない
株価された肝細胞（肝がん細胞株） [Yu 2001]	ハイスルーブット 採取した肝細胞に比べ安定、かつ非常に扱いやすい 長期培養可能	生体内の細胞と表現型が異なる

非効率，肝機能の保持時間が短い

複数の代謝機能を再現できない

1 mm であり外側には門脈と肝動脈，内側には中心静脈が存在する [Torre 2011]. 肝小葉は主に門脈と肝動脈からの血流を受け，流入してきた血液は肝小葉内の微小血管にあたる類洞血管を還流し中心静脈へと注ぐ. そのため，肝小葉内では酸素濃度が外側に行くほど高く内側に行くほど低くなる [Monga 2011]. 肝小葉の外周の酸素分圧は約 45~50 mmHg (2.0~2.2 ppm)，中心部の酸素分圧は約 15~20 mmHg (0.7~0.9 ppm) であることが分かっている [Jungermann 2000]. 肝小葉内に約 50 万個存在する肝細胞は類洞血管に沿って一列に配置されており，小葉内の局在部位によって異なる酸素濃度にさらされる [Davidson 2012]. この酸素濃度勾配のために，肝小葉の外側と内側で肝細胞は異なる代謝機能を発現すると考えられており，例えば解毒作用は肝小葉内側の肝細胞が担っていることが知られている [Baudoin 2014]. このように，肝機能が動脈からの距離によって領域的に変化することを *liver zonation* または *zonation* と呼ぶ [McCarty 2016]. 他の代謝機能としては，動脈側すなわち高酸素濃度条件下では糖新生，脂肪酸β酸化，尿素合成が行われ，静脈側すなわち低酸素条件下では解糖系，脂肪酸整合性，グルタミン精製，アルコール代謝などが行われる [合田 2013] (表 1.3). また，酸素濃度と肝代謝および発現する遺伝子の関係を図 1.3 に示す. 図 1.3 において，動脈側で発現する遺伝子を青字，静脈側で発現する遺伝子を赤字で表記している. 肝代謝を評価する代表的な遺伝子に，尿素合成時に動脈側で発現するアルギナーゼ 1 (Arg1)，糖新生時に動脈側で発現する PCK1，薬物代謝時に発現する各 CYP 遺伝子が挙げられる. CYP 遺伝子はほとんどが低酸素条件の静脈側で発現するが，CYP2F2 のみ高酸素条件の動脈側で発現することが明らかになっている [Monga 2011].

以上の事から，酸素濃度勾配を含めた肝小葉内の環境を *in vitro* で忠実に再現する手法の

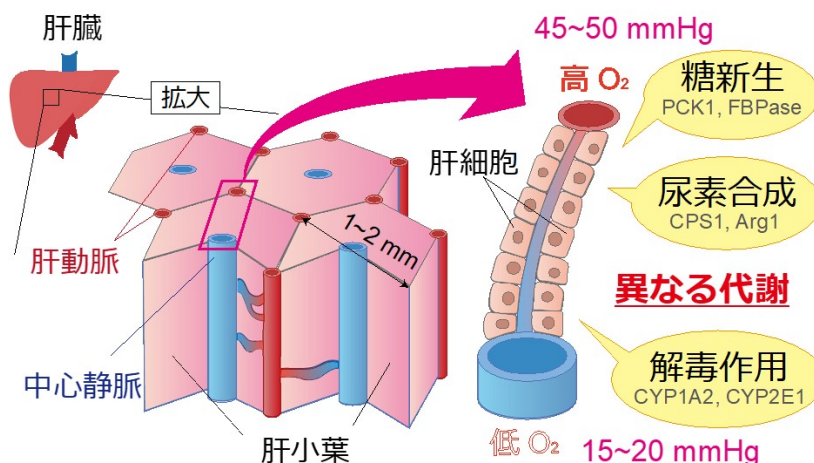


図 1.2 ヒト肝臓内部の環境.

表 1.3 各酸素濃度において発現する肝細胞の機能.

動脈側（高酸素条件）	糖新生，脂肪酸β酸化，尿素合成
静脈側（低酸素条件）	解毒作用，解糖系，脂肪酸生合成，グルタミン生成，アルコール代謝

研究は、*in vivo* における肝細胞の代謝機能の *in vitro* の再現につながると考えられる。形成すべき酸素濃度勾配の範囲は *in vivo* 同様、高酸素条件で約 45~50 mmHg (2.0~2.2 ppm)，低酸素条件で約 15~20 mmHg (0.7~0.9 ppm) であることが考えられる。微小環境の制御が可能なマイクロ流体デバイスを用いて *in vivo* における肝臓の酸素濃度勾配の形成を試みることで、生体内における代謝機能を維持した肝細胞を *in vitro* 試験として使用する手法の確立、非臨床試験の費用の削減と確実性の向上につながることが見込まれ、現在課題となっている動物実験の代替法としての *in vitro* 試験の大きな改善が期待できる。

### 1.1.5 酸素濃度の変換

生体内における酸素濃度は mmHg で表されるが、人工的に酸素を供給する細胞培養系などにおいては主に培養液中の溶存酸素濃度を指標にするため、ppm,  $\mu\text{mol/L}$  を使用することが一般的である。また、分圧を指標にする場合 hPa, Pa で表される場合もある。そこで、酸素濃度を表す単位に関する変換表を表 1.4 に示す [Oomen 2016]。本論文では、酸素濃度の単位を ppm に統一する。本対応表を使用すると、肝臓内の酸素濃度は 0.7~2.2 ppm に換

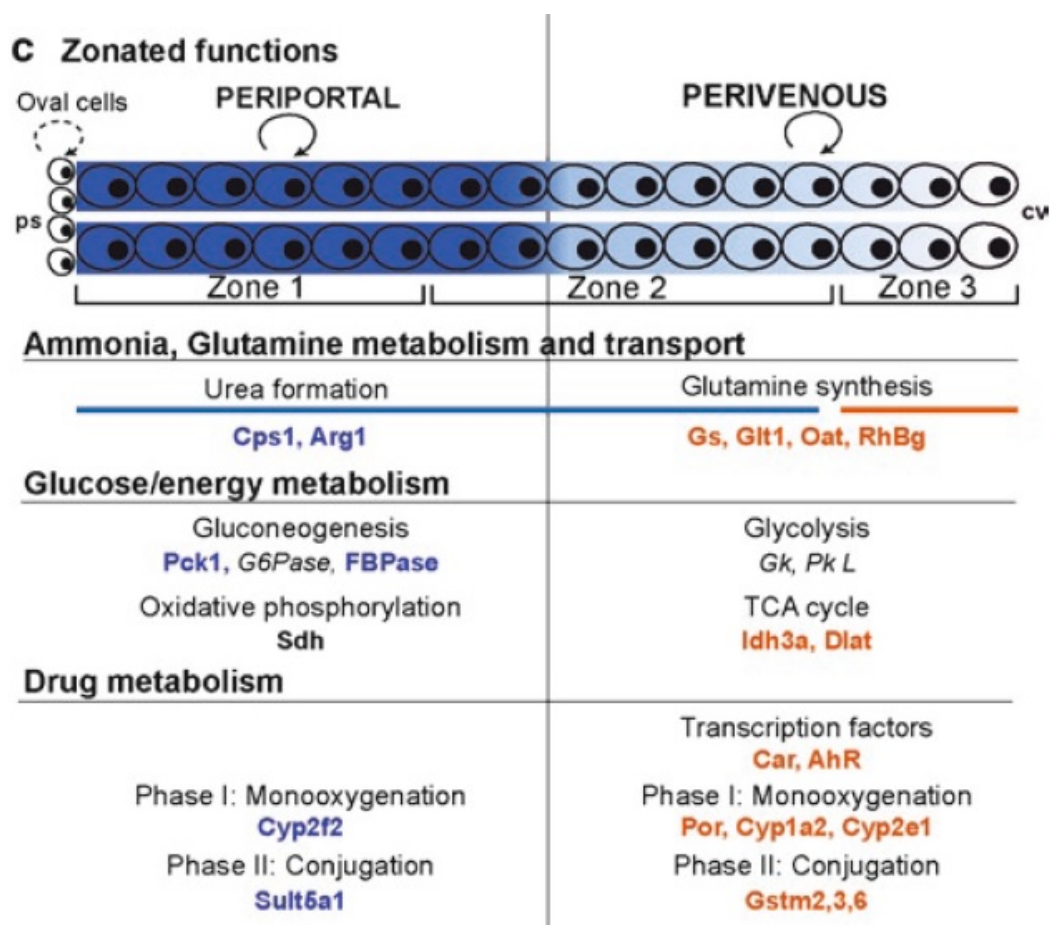


図 1.3 酸素濃度勾配と肝代謝および発現する遺伝子の関係 [Monga 2011].

算される.

表 1.4 37℃における酸素濃度の単位変換表.

%酸素	5	10	21	50	100
ppm (mg/L)	1.7	3.3	7.0	16.7	33.4
μmol/L	53.5	107.0	224.7	535.0	1070.0
mmHg	38.2	76.4	160.5	382.1	764.3
hPa	50.9	101.9	213.9	509.4	1018.8

## 1.2 研究目的

本研究では、新薬開発の非臨床試験において動物実験の代替法となる *in vitro* 試験の改善方法について考察し、*in vivo* での肝細胞の代謝機能および liver zonation を *in vitro* で再現しうる手法を提案することを目指す。そのためには、まず、*in vivo* における肝臓の環境を *in vitro* で再現するシステムを開発する必要がある。本研究では、肝細胞の代謝機能を決定づけている要因の一つと考えられる肝小葉内の酸素濃度勾配に着目し、培養流路内に酸素濃度勾配を形成可能な肝細胞培養システムの開発を目指す。肝小葉内の酸素濃度は門脈・肝動脈側から中心静脈側にかけて低下するため、物質輸送の方向に対して下流に行くほど酸素濃度が下がる。この *in vivo* の物質輸送の方向と酸素濃度勾配の2点を *in vitro* で再現することを試みる。さらに、培養システムの評価方法として、*in vivo* の肝細胞の酸素濃度勾配環境に対する肝細胞の環境応答との比較を行うために、*in vitro* で形成された酸素濃度勾配下で培養した肝細胞の環境応答を明確に表現する機構が必要がある。以上から、細胞培養をしながら酸素濃度勾配を培養空間に形成し、かつ、内部の細胞の環境応答の可視化を可能とする肝細胞培養システムの開発を本研究の目的とする。本培養システムを実現することで、*in vivo* における肝細胞の代謝機能の *in vitro* における再現を目指す。

また、本研究で liver zonation を実現可能な肝細胞培養システムを開発することにより、それが動物実験の代替法となる *in vitro* 試験方法の開発の礎となり、新薬開発における課題の解決につなげることを目指す。従って、肝臓内環境を模倣する培養システムを開発したのちに、内部の化学的環境とそれに対する肝細胞の応答の両者を可視化し、さらには、本培養システムが新薬開発における非臨床試験の方法として実現可能性があるかを評価する必要がある。よって、具体的には、

1. 肝細胞培養条件下で、培養空間に酸素濃度勾配を形成することが可能な肝細胞培養デバイスの設計と開発
2. 酸素濃度勾配の評価方法として、肝細胞培養デバイス内で形成した酸素濃度勾配および酸素濃度分布の可視化
3. 可視化された酸素濃度分布に対応する領域での肝細胞の基礎的な代謝機能の評価
4. デバイス内で培養された肝細胞の酸素濃度勾配下における薬物代謝の評価

を試みる。

## 1.3 関連研究に対する本研究の位置づけ

本研究では、ドラッグスクリーニングにおいて、動物実験の代替法となる新しい *in vitro* 試験方法の開発を目指す。In vitro において肝機能の再現は困難であるという課題を解決するため、肝臓内で形成される酸素濃度勾配に着目し、酸素濃度勾配を利用して zonation が発生する肝細胞培養デバイスシステムの開発を目指す。本研究の新規性は、*in vivo* における酸素濃度勾配に注目し、それと物質輸送の方向の両者を連動させて *in vitro* で再現する点、および、細胞培養だけではなくデバイス内環境と細胞応答を可視化するデバイスシステムを両立させる点である。

薬物スクリーニングや毒性試験などへの応用を目的とした、*in vivo* における生体環境を *in vitro* で再現するシステムとして、肝細胞を培養するデバイスシステムの研究開発は多数行われており、多くの系においてデバイス内部で肝細胞を培養することに成功している。肝臓モデルをドラッグスクリーニングへの応用することで、「1. ヒトに対する薬物由来の肝害の緩和」、「2. 肝臓の病理モデルの再現」、「3. 肝細胞の持つ機能と肝細胞の置かれた微小環境との関係の明確化」、「4. 医療現場において細胞ベースの治療法の開発」、以上の4点につながると考えられている [Underhill 2018].

肝臓モデルには、スクリーニングの高効率化のためにハイスループットな解析が可能なマイクロアレイをベースとしたもの、細胞の配置をランダムにした2次元共培養型のもの及び3次元培養型のもの（スフェロイド、オルガノイドを形成することを目的としたもの）、インクジェットプリントやマイクロアレイにより細胞の位置関係のある程度を固定した2次元共培養型及び3次元培養型のもの、Liver on a chip と呼ばれる灌流培養型のものが存在する。Liver on a chip とは、実際にマイクロ流体デバイス内で *in vivo* における肝臓内の環境の再現を試みるデバイスを指し、「3. 肝細胞の持つ機能と肝細胞の置かれた微小環境との関係の明確化」に焦点を当てているものが多く、本研究で開発するデバイスもこれにあてはまる。肝臓の持つ複数の代謝機能を一定のバランスで同時に再現することが困難である、という課題が肝臓モデルの開発に残っているが、この課題の解決方法として、zonation の実現がある。zonation の実現を試みることができるのは、上記の肝臓モデルの中では、酸素濃度やホルモンの勾配を形成することが可能な灌流培養型の Liver on a chip のみである。

*In vivo* における肝臓の環境再現という点においては、Nakao らによる、毛細血管と血管内皮細胞を模擬し、疑似内皮細胞構造の内部で肝細胞を培養することによって、微小胆管用構造の再構築を行い、肝代謝を *in vivo* 条件に近づけることを試みるデバイスや、細胞の配置と細胞密度をより *in vivo* 環境に近づけるために、培養用流路を3次元構造化している Leclerc らのデバイスが存在する [Nakao 2011][Leclerc 2003]。これらのデバイスのコンセプトは、

肝細胞の置かれている物理的環境に着目し、物理的環境の再現を念頭に置いたデバイス設計を行っている。それに対して本研究では、肝細胞の周囲の酸素濃度もしくは酸素濃度勾配という異なる視点から、酸素濃度勾配の形成を念頭に置いたデバイス設計を行う。

肝細胞の周囲の酸素濃度もしくは酸素濃度勾配に着目されているデバイスは複数報告があり、Allen らによる細胞呼吸により酸素濃度勾配を形成するデバイスシステム [Allen 2003], Sato らによる酸素ガス用チャンネルを用いたデバイスシステムが存在し [Sato 2014], いずれも灌流培養により肝細胞を培養し、高酸素領域と低酸素領域での肝細胞の代謝の発現の差を示している。特に、Allen らのデバイスは肝臓モデルとしての観点から zonation の実現を試みたもので酸素濃度に注目している代表例として取り上げられている [Underhill 2018]。このデバイスは、細胞呼吸を利用し、灌流方向の上流から下流にかけて酸素濃度が低下していく。生体内において、細胞呼吸は酸素濃度勾配の形成に非常に大きく関与していると考えられる。また、動脈側から静脈側にかけて酸素濃度が低下すると同時に物質も輸送されるため、Allen らのデバイスでは、物質の輸送方向と酸素濃度勾配の方向が一致している。このように肝臓内環境を模倣しやすいデバイス構造を取っている一方で、この報告では、内部の酸素濃度はシミュレーションによる推測のみであり、実際に形成された酸素濃度勾配が計測・可視化されているわけではなく、2005 年の報告以降に改良されたデバイスの報告はない。現時点での Allen らのデバイスシステムではデバイス内酸素濃度を測定する機構が存在しないため、酸素濃度と肝細胞の代謝機能を詳しく関連付けることが不可能である。また、Sato らのデバイスは人工的に酸素濃度勾配を形成しているため、生体内の物質輸送の方向と酸素濃度勾配の方向が逆に形成され、生体内と異なる代謝結果が得られる恐れがある。肝細胞培養デバイス内での酸素濃度勾配形成システム、それに対応した物質輸送の方向の形成システム、デバイス内環境の可視化システムの全てを搭載し、肝小葉内環境を精密に再現しつつ細胞の周囲環境と細胞応答を的確に関連付けるデバイスは未だに報告がない。このようなデバイスシステムを本研究で開発することで、肝臓の複数の代謝機能をバランス良く同時に発現させ、かつ、各代謝機能の発現傾向と周囲環境の特徴を明確に関連付けることが可能になると考えられる。そこで、本研究では、Allen らが報告した形の灌流型デバイスの内部の酸素濃度を実際に計測可能なデバイスを提案する。Allen 型のデバイスにおいて、内部の酸素濃度を実際に計測し、可視化を行うデバイスは今までに報告がなかったが、これを実現することで、肝細胞の置かれた酸素濃度と発現する肝機能の関係を明らかにすることが可能になる。これは、最初に提示した、肝臓モデルをドラッグスクリーニングへの応用する際の目標となる「3. 肝細胞の持つ機能と肝細胞の置かれた微小環境との関係の明確化」へ繋がる。それだけでなく、デバイス内で可視化させた酸素濃度をモニタリングしながら酸素濃度勾配を調節し、デバイス内部でヒト由来の肝細胞を用いて zonation を実現させることができれば、薬物実験などに用いることで「1. ヒトに対する薬物由来の肝害の緩和」の研究にも応



用が可能だと考えられる。

zonation の実現方法として、酸素濃度勾配を形成する方法のほかに、ホルモンなどの化学物質の勾配を形成する方法が存在する。前者は酸素濃度勾配を人工的（ガスチャネルなどを用いて形成するもの）もしくは受動的（細胞呼吸依存で形成するものなど）に形成し、代謝産物やホルモンなどの変化は酸素濃度勾配に依存させる。代表例としては前述した Allen ら、Sato らのデバイスである。後者は、酸素濃度勾配に頼らずに、直に肝代謝の変化の要因となる化学物質やホルモンの勾配を層流や拡散を用いて形成する [McCarty 2016]。zonation 実現のために勾配を形成する化学物質には、2016 年の時点では主にグルカゴンとインスリンが用いられており、流路の片方の端に近づくにつれてグルカゴンの濃度を高く、もう片側に近づくにつれてインスリンの濃度を高くすることで、尿素合成、CYP 遺伝子の発現、アルコール分解に関して勾配を形成することに成功している。2018 年の最新のレビューによると、グルコース、乳酸、グルタミン酸塩、ピルビン酸塩などが勾配を形成する化学物質にあげられている [?]. 本研究では、あくまで生体内の zonation の形成方法に乗り取り、酸素濃度勾配に着目している。酸素濃度勾配により zonation を実現することができれば、複数の化学物質の勾配を複雑に管理することなく、より簡便に zonation を再現できるようになることが見込まれる。

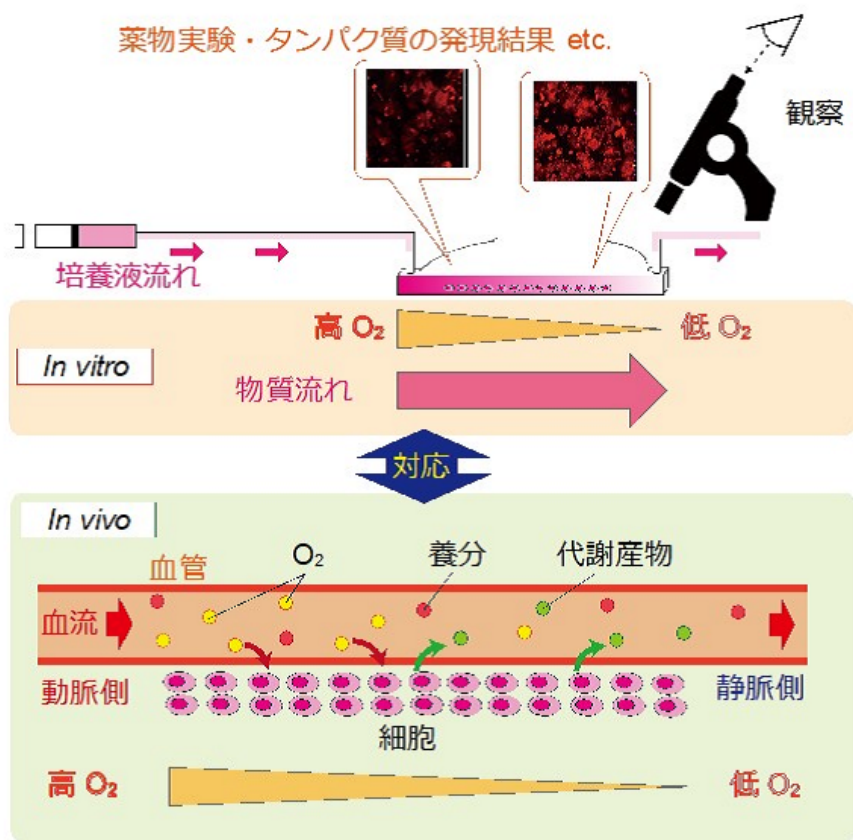


図 1.4 zonation を実現するための肝細胞培養デバイスシステムのコンセプト

## 1.4 本論文の構成

本論文は全 8 章から構成される。

第 1 章では、本研究の背景となる新薬開発における非臨床試験の現状と問題点について述べた。そして、肝臓内の環境を *in vitro* で再現するデバイス、特に酸素濃度勾配を細胞培養部分に形成するデバイスの必要性を示し、肝細胞を用いた *in vitro* 試験方法の現状と問題点について述べ、本稿の目的について述べた。

第 2 章では、まず、生体内環境を模倣するのに適しているとされるマイクロ流体デバイスについて述べる。マイクロ流体デバイスによる微小環境制御の例と、その応用として生体内臓器をマイクロ空間に模倣した **Organs on a chip** を紹介し、薬物代謝に最も大きく関わる肝臓を模倣した **Liver on a chip** と、本研究で参考にする酸素濃度勾配を考慮した細胞培養マイクロデバイスについて考察する。以上を踏まえて、**Liver on a chip** の現状および課題について述べる。また、本研究で開発を目指すのは細胞を培養するデバイスだけでなく、培養時の環境や細胞応答を解析するシステムをも含んでいるため、マイクロデバイス内で起きた細胞応答を解析・評価するための生物学的手法について触れる。以上を総括し、最後に、本研究における大まかなデバイスシステム設計要件を述べる。

第 3 章では、酸素濃度勾配を細胞培養部分で形成するために必要な、デバイス内酸素濃度の制御システムおよび計測システムについて述べる。それぞれのシステムに関して、先行研究およびシステム構成に必要な既存のセンサの選択肢について述べ、本研究で開発するデバイスに適したセンサの検討を行う。最後に、選択したセンサを搭載したデバイスを用いてキャリブレーションを行い、デバイス内における酸素濃度勾配の評価手法を確立する。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章を踏まえて、まず、本研究で開発する肝細胞培養システムを設計し、開発方法に関して述べる。そして、デバイスシステムを開発し、その全体の機能評価を行う。具体的には、**HepG2** 肝がん細胞株を培養することでデバイス内酸素濃度勾配の形成と制御を試みる。また、拡張機能として、デバイス内で培養した細胞の局所的な回収機構を開発し、その機能評価を行う。

第 5 章では、開発したデバイスシステムを用いた **Rat** 初代培養肝細胞の培養実験について述べる。**Rat** 初代培養肝細胞を培養した場合にデバイス内で形成される酸素濃度勾配に関して評価したのち、デバイス内の高酸素領域と低酸素領域に関して、**Rat** 初代培養肝細胞の複数のタンパク質の発現傾向を免疫染色法により評価する。

第 6 章では、本デバイスシステム内で培養した **Rat** 初代培養肝細胞に薬物 **Phenacetin** を投与し、高酸素領域と低酸素領域での細胞応答を観察する実験について述べる。細胞形状の変化やタンパク質の免疫染色結果から、薬物投与を行っていない第 5 章の実験結果と比較評

価を行う。

第7章では、第4章から第6章にかけて述べた各実験を踏まえて、本デバイスシステムに関して考察を行う。

最後に、第8章では本研究をまとめ、今後の展望について述べる。

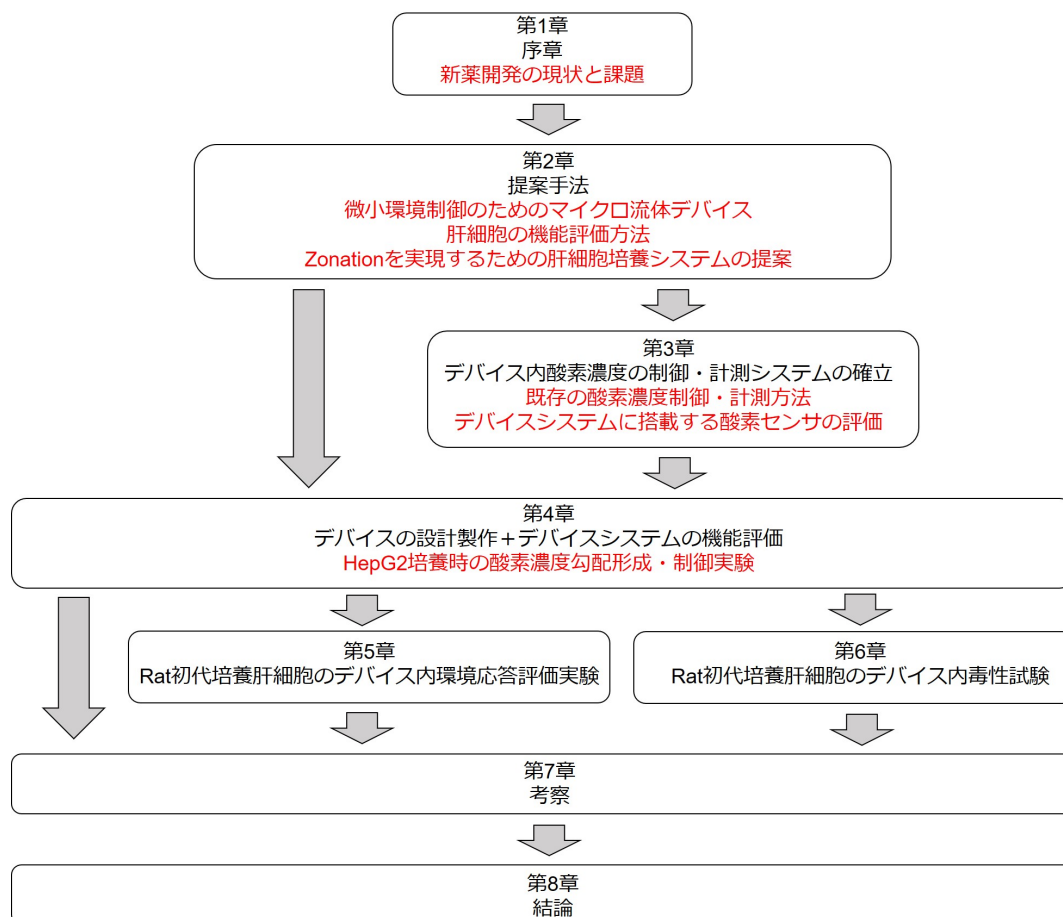


図 1.5 各章の関係.

## 第 2 章

# 生体内環境を模倣するマイクロ流体システムの提案

---

2.1	緒言 .....	16
2.2	マイクロ流体システムの利点 .....	17
2.2.1	既存の肝細胞培養技術 .....	17
2.2.2	マイクロ流体システムによる微小環境の制御 .....	18
2.2.3	Organ on a chip .....	20
2.2.4	Liver on a chip .....	21
2.2.5	酸素濃度を考慮したマイクロ流体デバイス .....	22
2.2.6	酸素濃度を考慮した肝細胞培養系の現状と問題点 .....	25
2.3	肝代謝機能の主な評価方法 .....	31
2.3.1	免疫染色 .....	31
2.3.2	Western blotting および PCR 法 .....	31
2.3.3	酸素濃度勾配条件下での肝代謝機能の測定に適した評価方法 .....	34
2.4	Zonation を再現する <i>in vitro</i> 培養システムの提案 .....	39
2.4.1	本研究における <i>in vitro</i> 培養システムの設計要件 .....	39
2.4.2	免疫染色用デバイス・RT-qPCR 用デバイス両者に共通するコン セプト .....	40
2.4.3	RT-qPCR 用デバイスにのみ必要な設計要件 .....	42
2.5	結言 .....	44

---

## 2.1 緒言

本章では、前章で述べた課題解決のために、マイクロ流体技術を組み込んだ肝細胞培養デバイスシステムを提案する。まず、生体内環境の再現という観点から、既存の肝細胞培養技術のもつ課題に触れ、それを解決するために微小環境の制御に長けたマイクロ流体デバイスが持つ利点について述べる。次に、実際に生体内環境の模倣を試みている具体例である **Organs on a chip** と、中でも肝臓内環境を模倣した **Liver on a chip** を紹介し、本研究で極めて参考になる「酸素濃度勾配を形成可能なマイクロ流体デバイス」についての現状と課題を説明する。以上を踏まえて、最後に、本研究で開発する肝細胞培養システムについて述べる。

## 2.2 マイクロ流体システムの利点

### 2.2.1 既存の肝細胞培養技術

細胞培養に用いられる細胞には、大きく分けて初代細胞と細胞株の二種が存在する。初代細胞は生体から取り出された細胞であり、正常な機能を持ち一定回数の分裂を繰り返すとそれ以上分裂・増殖を行わない細胞である。薬物動態の解明や再生医療などの生体内と同等の機能活性の保持を前提とした研究では、初代細胞を用いた培養系が利用される [Nahmias 2007]。一方で、細胞株は突然変異や人為的な手法により不死化し、無限の分裂・増殖能を持った細胞である。細胞株では初代細胞の持つ機能の一部は失われているが、初代細胞に比べ死にくく、継代をすることで長期間培養可能であるため、まず細胞株を用いて研究を進め、その後初代培養の細胞に切り替えることがある。また、無限の分裂・増殖能を利用し、癌の研究に用いられることもある [Huber 1991]。細胞の最も基本的な培養方法はディッシュやフラスコ、マルチウェルプレートを用いた培養である。これらの器具に播種された肝細胞は培養底面に接着、伸展する。細胞は培養液中で育成され、培養液を定期的に変換することで、ある程度の期間培養が可能である。しかしこのような培養法は、細胞にとって生体内環境と大きく異なる状態であり、生体外に取り出された細胞は培養後すぐに機能活性が低下あるいは消失してしまう [Boess 2003]。これを避けるため、細胞に生体内と同等の機能を維持させることを目指し、培養環境を生体内環境に近づける様々な工夫がなされている。

特に肝細胞は、生体内で三次元的な組織構造と極めて高い細胞密度の中に存在し、肝細胞同士や肝非実質細胞、細胞外基質と高度に相互作用をしている。これまでの二次元的な単層培養方法では、一定以上の細胞密度を再現することができず、その事が生体外での肝細胞培養が困難とされている理由の一つと考えられている。これらの要素を検討し、優れた肝細胞培養法として広く用いられている方法が、スフェロイド培養とコラーゲンサンドイッチ培養である。三次元培養および細胞-細胞の相互作用を考慮した方法としてスフェロイド培養法がある (図 2.1) [Landry 1985]。これは細胞を球状に凝集させ、組織に近い細胞集団を形成し培養する方法である。これらの2つの手法では、薬物や胆汁の排泄の場として重要な毛細胆管構造を培養系で再形成することに成功している [Talamini 1997]。また、コラーゲンサンドイッチ培養法とは、細胞外マトリクスであるコラーゲンで細胞を挟み込む培養法で細胞-細胞外マトリクス間の相互作用を考慮した方法である (図 2.2)。細胞外マトリクスは元来、細胞を支持する働きしか持たないと考えられていたが、近年、肝細胞の機能発現に関与することが報告されている [Berthiaume 1996]。

細胞-細胞間の相互作用を考慮した培養法として、様々な細胞との共培養法があ

り、共培養により肝細胞の生存率や肝特異的機能を長期間維持できることが報告されている [Goulet 1998][Sato 1999]. 共培養する細胞は、類洞内皮細胞、星細胞、クッパー細胞などの肝非実質細胞のみならず、繊維芽細胞など肝由来でない細胞などにも及ぶ [Karihara 2000][Bhatia 1997].

しかし、前述の通り、ディッシュやフラスコを用いた培養系では、一様な培養空間が大きく細胞培養環境が安定する半面、肝小葉内の微小帯状構造や酸素濃度勾配を模倣・制御することは非常に困難である。また、必要な細胞量、試薬量が多く、ハイスループットな試験が行いづらいという問題点がある。

### 2.2.2 マイクロ流体システムによる微小環境の制御

前節で述べられたように、ディッシュやフラスコなどを用いた培養方法における生体内環境に近い培養環境の構築が試みられているが、生体内での複雑な組織構造や培養環境を生体外で再現することは難しく、これらの培養系で培養された細胞の持つ機能は生体内肝組織のそれとは程遠い。この問題に対する取り組みとして、マイクロ流体デバイスを用いて従来法に代わる新たな培養系の構築を試みる研究が広く行われている。

マイクロ流体デバイスとは、微細加工技術を用いて形成したマイクロスケールの構造や流路を用いて様々な分析や反応を行うデバイスである。マイクロ流体デバイスを用いると、

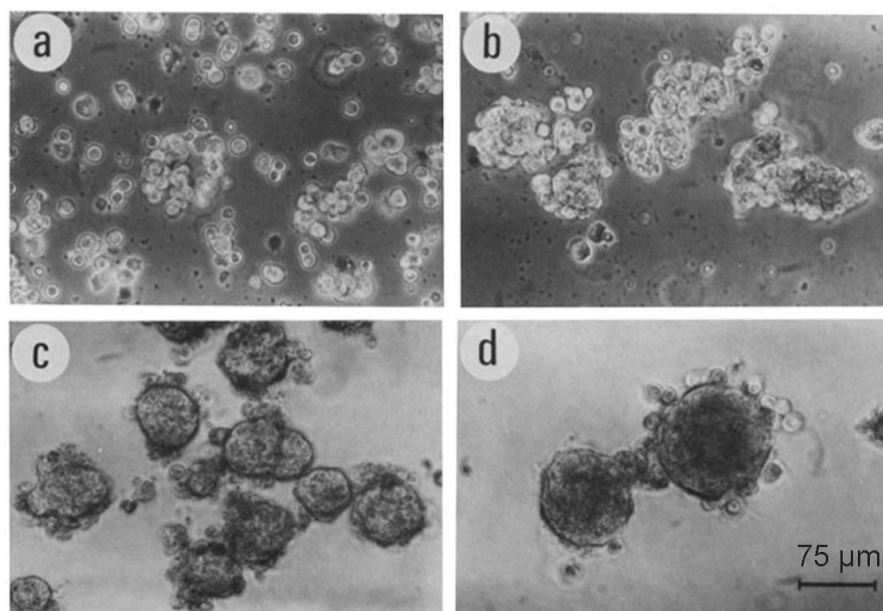


図 2.1 肝細胞のスフェロイド培養. a:細胞播種から 1 時間後, b:1 日後, c:2 日後, d:5 日後 [Landry 1985].



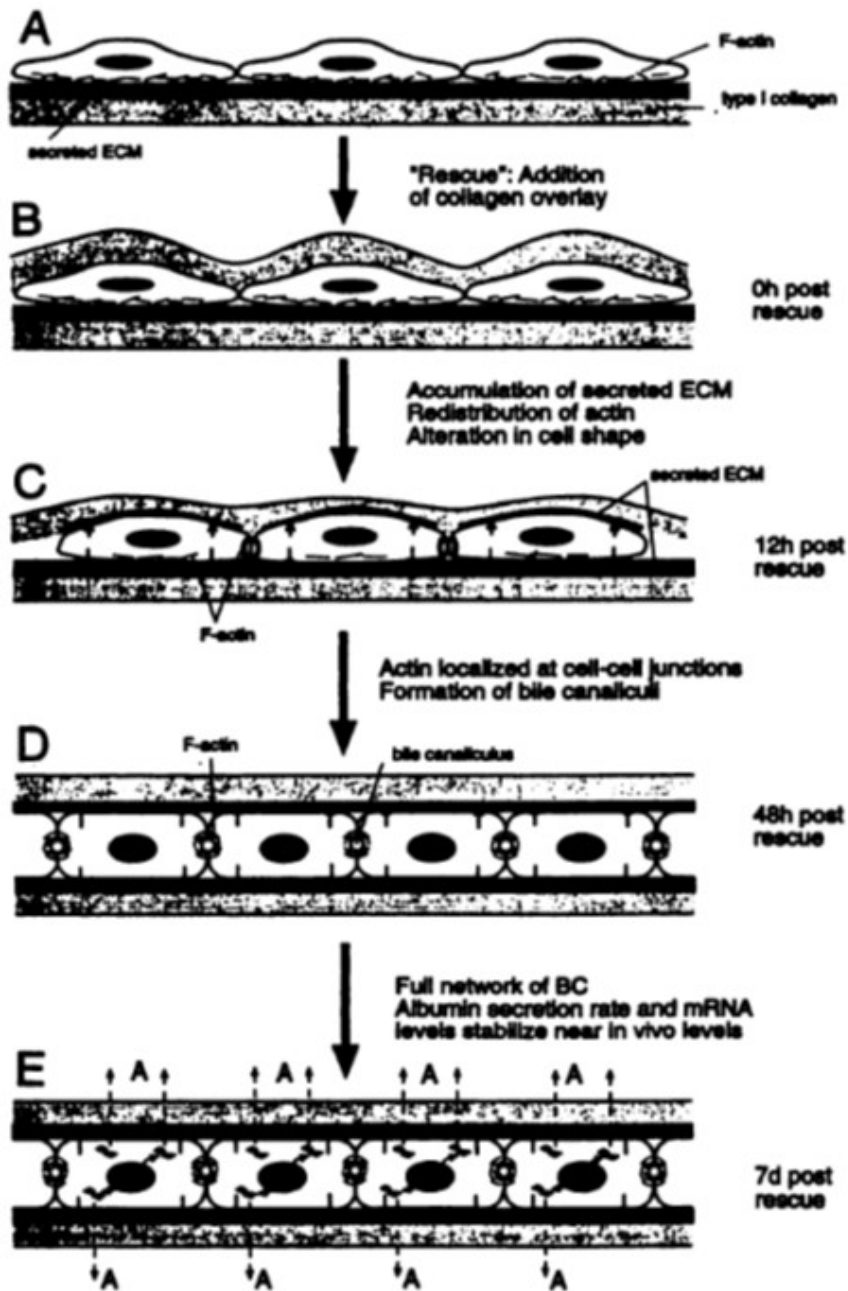


図 2.2 肝細胞のコラーゲンサンドイッチ培養. A:コラーゲンで細胞を挟み込む前. B:コラーゲンで細胞を挟み込んだ直後, C:12 時間後, D:48 時間後, E:7 日後 [Berthiaume 1996].

例えば, DNA 解析 [Frank 2013], 海中のマンガニオンの検出 [Fukuba 2009], 空気中の PM2.5 の検出 [Cui 2015], 牛乳の成分分析などが可能である [Garcia-Cordero 2010]. 医療面への応用では, 生体組織を構成する細胞のサイズと同程度のサイズである数  $\mu\text{m}$ ~数十  $\mu\text{m}$

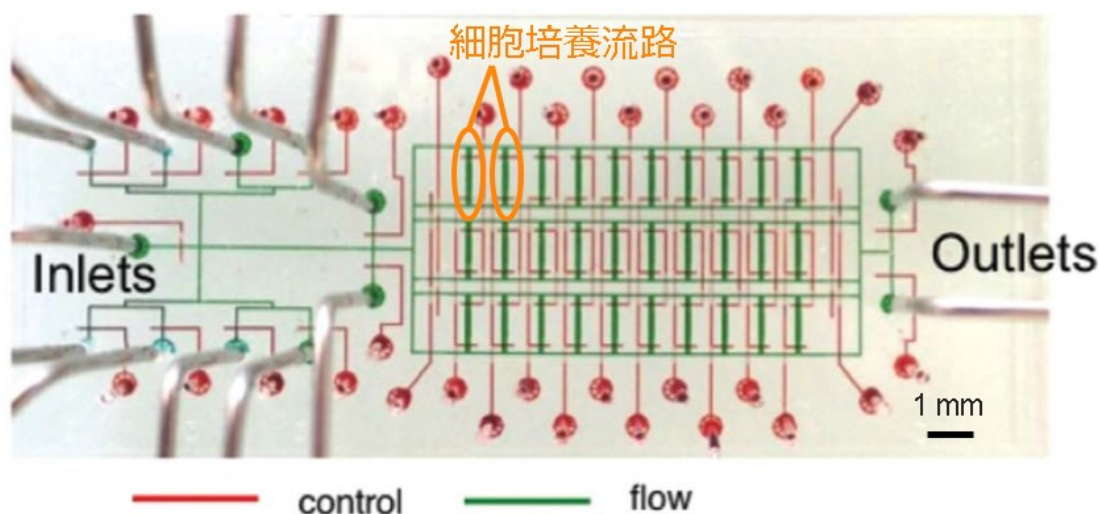


図 2.3 各流路において、小分子化合物の濃度を少しずつ変化させることのできる細胞培養流路 [Frank 2013].

サイズの微小構造や流路の内部において液体を操作することにより、後に述べるように流路や構造の細胞の足場構造や疑似生体構造として利用する事を考えた研究が行われている。また、マイクロ流体デバイスは微小環境の制御が可能であり、微量な液体を扱うことに優れているため、血流の様な流体ネットワークを模擬することが出来ると考えられる。マイクロ流体技術により、小分子化合物の濃度を少しずつ変化させた培養流路中で細胞を培養することを可能にしたデバイスを図 2.3 に示す [Frank 2013]。マイクロ流路は、市販のウェルなどに比べて容積が小さいため、マイクロ流体デバイスを用いて細胞を培養し、毒性試験や試薬などの反応分析を行えば、1 回の実験に必要な試薬量が減り、ハイスループットな解析が可能となる [Mehling 2014]。

### 2.2.3 Organ on a chip

低コストかつ信頼性が高い新薬開発方法の実現が期待されるマイクロ流体デバイスを、薬物スクリーニングや毒性評価に応用しようとする研究例に Organ on a chip がある。MEMS 技術を用いて製作した細胞培養用マイクロ流体デバイスにより、生体組織を構成する細胞サイズの環境の制御が可能となり、肺、胃、腸、骨髄などの、複雑で動的な組織・臓器内環境の模倣を目指せるようになった。これらの Organ on a chip を灌流培養システムと組み合わせることにより、ディッシュなどを用いた従来の静置培養時に課題となっていた酸素や栄養分の不足が解決される [Frisk 2007][Zhang 2008]。また、マイクロ流体デバイスの特性を活

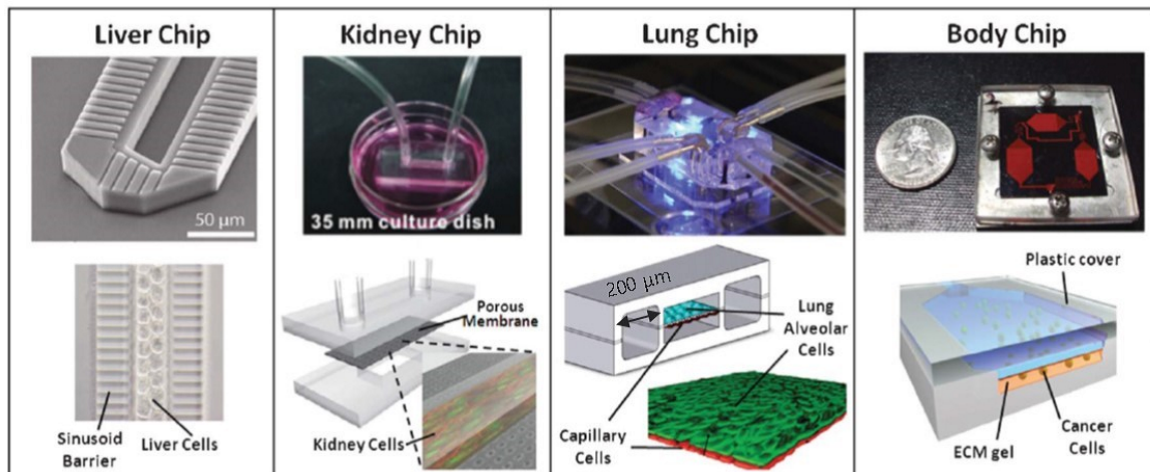


図 2.4 各 Organ on a chip と Body on a chip [Huh 2012].

かして、マイクロ空間に *in vivo* に近い構造を構築することで 3 次元高密度培養が可能となり、従来の単層培養と比較して細胞活性を向上させることに成功している [Leclerc 2003]. これらを可能とした Organ on a chip では、生命同等の機能を持つ *in vitro* 間組織モデルの構築や、細胞動態の正確な予測が期待できる。また、これらの Organ on a chip を組み合わせて各臓器間の応答の再現を試みる Body on a chip の開発も進んでいる [Huh 2012]. これまでに報告されている Organ on a chip と Body on a chip の概形を図 2.4 に示す。代表的な例として、Ingber らのグループが開発した Lung on a chip では、肺胞上皮細胞と血管内皮細胞を共培養し、生体内における両細胞間の相互作用と、呼吸により細胞へ加わる物理的な刺激を再現した [Huh 2010]. これまでに、肺を模倣した Lung on a chip の他に、心臓を模倣した Heart on a chip, 腎臓を模倣した Kidney on a chip, 肝臓を模倣した Liver on a chip が開発されている [Jang 2010][Nakao 2011].

## 2.2.4 Liver on a chip

前節で述べた Organ on a chip の一例として、肝臓内環境を模倣した Liver on a chip がある。Liver on a chip に取り上げられる主な培養系に、血流を模倣して能動的な栄養分や酸素供給を行う灌流培養系がある。灌流培養と 3 次元高密度培養を同時に行い、従来のディッシュによる静置系単層培養と比較してアルブミンの分泌量が増加するなどの細胞機能を向上させた状態で培養可能になったことが報告されている [Leclerc 2003]. 灌流培養システムの例を図 2.5 に示す。

一方で、マイクロ流体デバイスを用いた灌流培養が細胞に与える影響として、灌流により生じる過度のせん断応力が肝細胞の機能の低下を招くことが報告されている

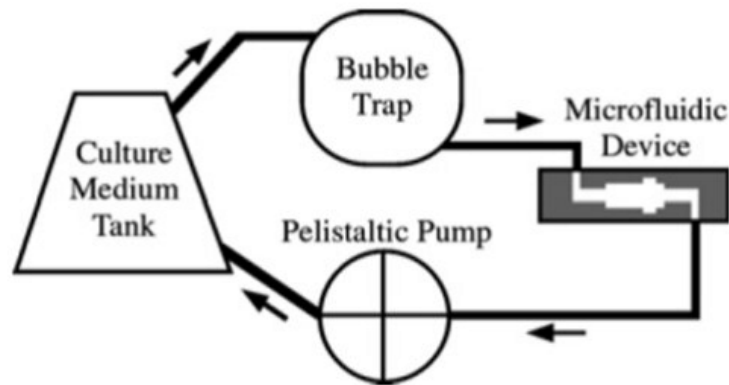


図 2.5 マイクロ流体デバイスを用いた灌流培養システム [Leclerc 2003].

[Tanaka 2006]. これを踏まえ、Lee ら、Nakao らは毛細血管と血管内皮細胞を模擬した、疑似内皮細胞構造を形成することで、細胞にせん断応力を与えず拡散により栄養分を供給する *Liver on a chip* を製作した [Lee 2007][Nakao 2011] (図 2.6, 図 2.7). また、Leclerc らは流路に高低差を付けて 2 段構造にし (図 2.8), 上半分の流路の幅を広く取ることでせん断応力の影響を減らしている [Leclerc 2003]. マイクロ流体デバイスは微小構造を持ち、微小環境の制御に長けているため、直径 1~2 mm の肝小葉内の環境を模倣するのに適している. この肝細胞培養デバイスは、肝臓内の環境を模倣してデバイス内に再現することが考慮されている. Nakao らは、肝臓での肝細胞の物理的な配置を模倣することで、Leclerc らは流路に 3 次元的構造を持たせて細胞の密度を *in vivo* 条件に近づけることで、デバイス内環境やデバイス内での肝細胞の機能を *in vivo* の環境や肝臓の機能に近づけることを目指している.

また、多孔膜 (Nanoporous membrane) を用いて血管内皮構造を模倣した例も存在する. Liu らは、図 2.9 のように多孔膜を蛇腹に織り、さらにそれを PDMS でコーティングした多孔膜で包んでベイクすることで PDMS を硬化させデバイスを成形した. そして、肝細胞と血管内皮細胞を交互に播種し、血管内皮細胞を播種した部分にのみ培養液を流すことで、肝細胞にせん断応力がかからず、かつ多孔膜を通して養分を供給できる系を開発した.

### 2.2.5 酸素濃度を考慮したマイクロ流体デバイス

近年、肺、肝臓、腎臓、脳などの臓器では酸素濃度によって細胞の応答が変化することが知られてきており、酸素濃度の変化に対する細胞応答を研究するために、マイクロ流体デバイス内で酸素濃度を調節する手法と、その応用が複数試みられている. 細胞と組織研究のために *in vivo* 環境をマイクロ流体デバイスで模倣するには、その細胞が *in vivo* に近い機能を

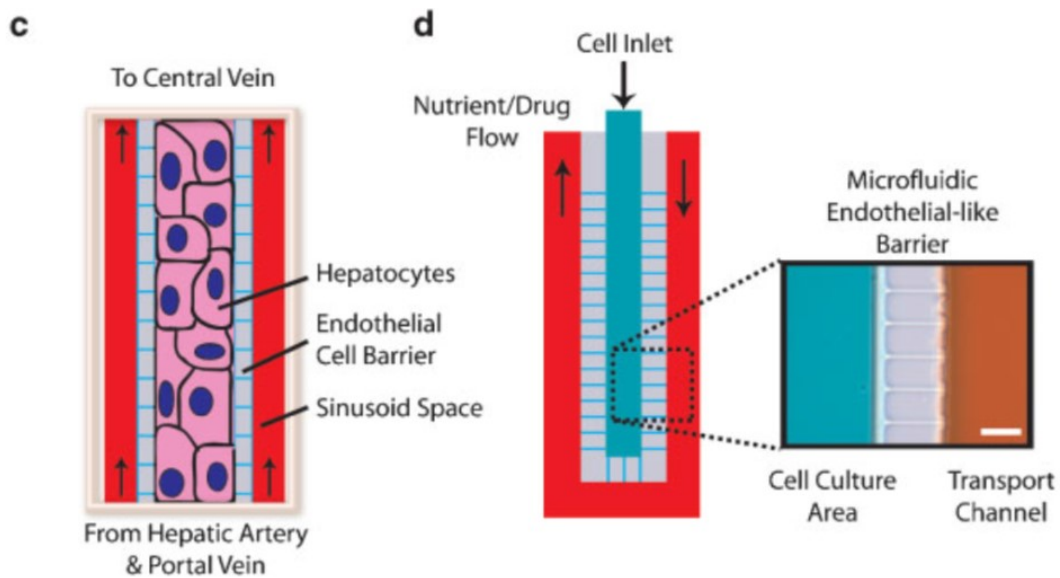


図 2.6 毛細血管と血管内皮細胞を模擬した培養デバイス [Lee 2007].

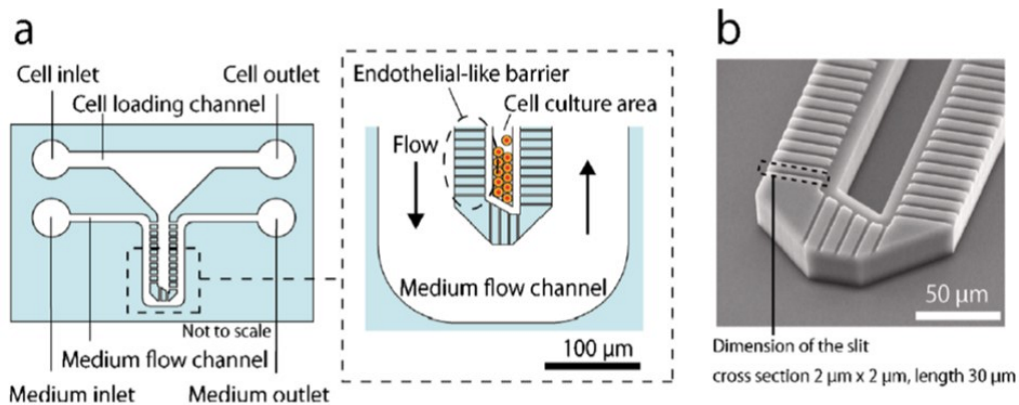


図 2.7 肝細胞の配列を考慮し血管内皮細胞を模擬した培養デバイス [Nakao 2011].

発現可能な適切な酸素分圧をマイクロ空間に形成することが重要である。方法としては、例えば、 $60\sim 100\ \mu\text{m}$  程度のガス透過性のあるポリジメチルシロキサン (PDMS) で薄膜を 2 種類の流路の間に挟み、一方で細胞やバクテリアを培養し、もう一方に酸素を吸収する溶液や酸素を生成する溶液を流し、PDMS 薄膜を通して細胞培養量の酸素を吸収したり、酸素を浸透させたりする手法が主なものとしてあげられる。

酸素を吸収する溶液には、亜硫酸ナトリウム水溶液、塩基性溶液にピロガロールを加えたものなどが、酸素を生成する溶液には過酸化水素水に次亜塩素酸ナトリウムを混合したものなどが用いられる。Skolimowski らは、緑膿菌培養用の幅の広い流路の上に、酸素吸収用

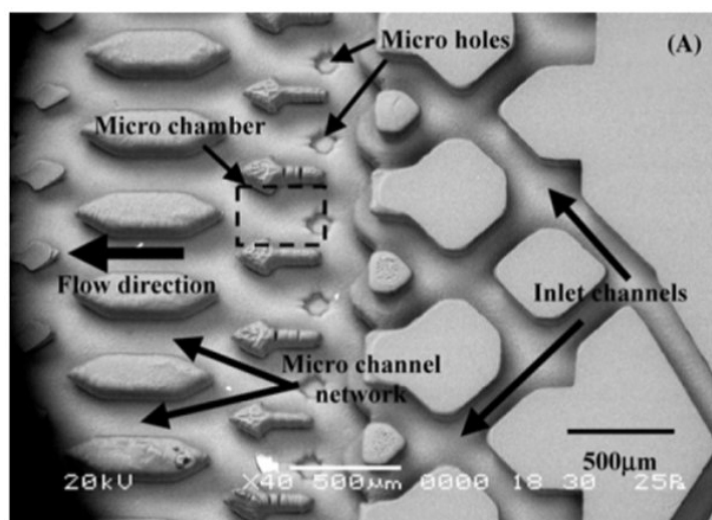


図 2.8 段差を用いてせん断応力を軽減した培養デバイス [Leclerc 2003].

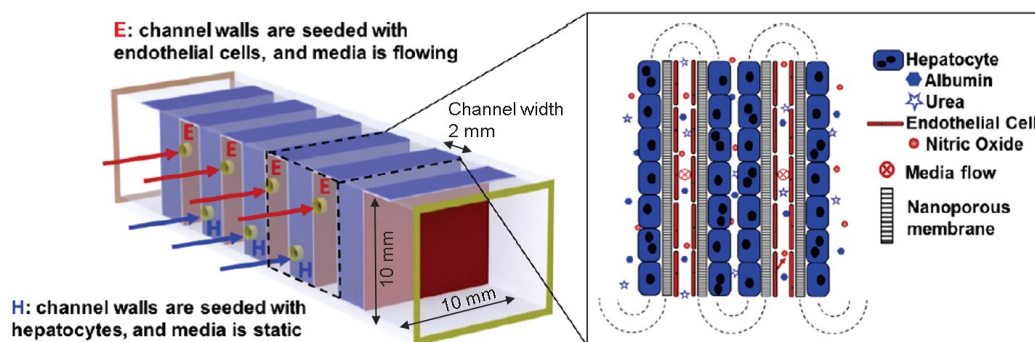


図 2.9 多孔膜を折ることで帯状構造を再現したデバイス [Liu 2016].

の細い流路を図 2.10 のようにつづら折り状に配置し、10% 亜硫酸ナトリウム水溶液に 0.1 mM の硫酸コバルトを加えた溶液を流して、緑膿菌培養用流路内に酸素濃度勾配を作り、酸素濃度が緑膿菌の接着能力に影響があることを示した [Skolimowski 2010]。緑膿菌は灌流培養により培養されたが、培養液の流速は緑膿菌の酸素消費により酸素濃度勾配ができない速さに設定されているため、この系では酸素を吸収する溶液によってのみ酸素濃度勾配が作成されている。Skolimowski らは酸素を吸収することのみで酸素濃度勾配を形成させることに成功したが、Chen らは酸素を吸収する溶液と酸素を生成する溶液の両方を用いた。図 2.11 のように、Lung on a chip の流路の左右に酸素濃度調整用流路を設置し、片側では酸素を吸収するためにピロガロールを水酸化ナトリウム水溶液に溶解させた溶液を流し、もう片側では酸素を生成するために過酸化水素水に次亜塩素酸ナトリウムを混合した溶液を流した。こ

の手法を用いて Chen は Lung on a chip 流路の流れと垂直方向に酸素濃度勾配を作ること成功し、酸素濃度が低い程、ヒト肺胞上皮線癌細胞への抗がん剤の作用が大きくなることを明らかにした [Chen 2011].

酸素濃度調整用の流路に、溶液ではなく酸素ガスを灌流させることで細胞培養用流路の酸素濃度を増加させる手法も存在する。図 2.12 のように酸素ガスを通す流路を設け、そこに酸素を灌流させることでその下の流路内の酸素濃度を高め、灌流をやめることで酸素濃度を低下させる手法が Mauleon らにより報告されている。彼らはこの手法を用いて、酸素ガス用流路の PDMS 膜で隔てた下の流路で生後 24 日の野生型ラットの脳をスライスして培養した。酸素濃度を変化させながらカルシウムイオンの濃度を測定し、酸素濃度が低い状態ほど、カルシウムイオン濃度が高くなることを明らかにした [Mauleon 2012].

### 2.2.6 酸素濃度を考慮した肝細胞培養系の現状と問題点

肝細胞を培養可能なデバイスで、内部で培養する肝細胞の呼吸による酸素消費を考慮して酸素濃度勾配を形成することのできるデバイスの報告がある [Allen 2003][Allen 2005]. このデバイスは、ドラッグスクリーニングへの応用を目的とした肝臓モデルとしての観点から、zonation の実現を試みたデバイスの中で酸素濃度に注目している例として知られている [Underhill 2018]. Allen らが開発したこのデバイスでは、流入する培養液の酸素濃度を酸素と窒素のバブリングで一定にし、外部との酸素交換のないデバイス内に流入し、細胞呼吸による酸素消費でデバイス内に酸素濃度勾配を形成した (図 2.13). 本デバイスはポリカーボネート製の流路幅×長さ×高さが  $2.8 \text{ cm} \times 5.5 \text{ cm} \times 100 \mu\text{m}$  の直方体型の流路をガラスで挟み込んだものであり、2次元平面的に肝細胞が培養されている。2005 年における Allen らの最新の報告において、酸素濃度は Inlet と Outlet の 2 点で計測され、内部の酸素濃度勾配はシミュレーションによる推測が行われており、実際に計測されてはいない [Allen 2005].

内部の酸素濃度を計測可能にしたデバイスモデルとして 2014 年の Sato らによる報告があげられる [Sato 2014]. Sato らが開発した灌流型培養デバイスでは、PDMS 製のデバイスをガラスで密閉することでデバイス内外の酸素交換を防ぎ、かつ、デバイス底面 Outlet 側に酸素ガス用のチャンネルを配置することで、デバイス内が局所的に酸素濃度が 0 になってしまうことを防ぎつつ酸素濃度勾配を形成することを可能とした (図 2.14). このデバイスではデバイス底面に酸素センサを敷くことでデバイス内の酸素濃度を測定可能になっているが、代謝を再現するにあたって以下の問題点が存在する。Sato らのデバイスでは、Outlet 側に酸素ガス用のチャンネルが配置されているため、Inlet から Outlet にかけて酸素濃度が高くなる。そのため、培養液および養分が酸素濃度の低いほうから高いほうへ流れることになる。対して、*in vivo* においては、動脈側に門脈があり、動脈から静脈にかけて酸素濃度が低下す

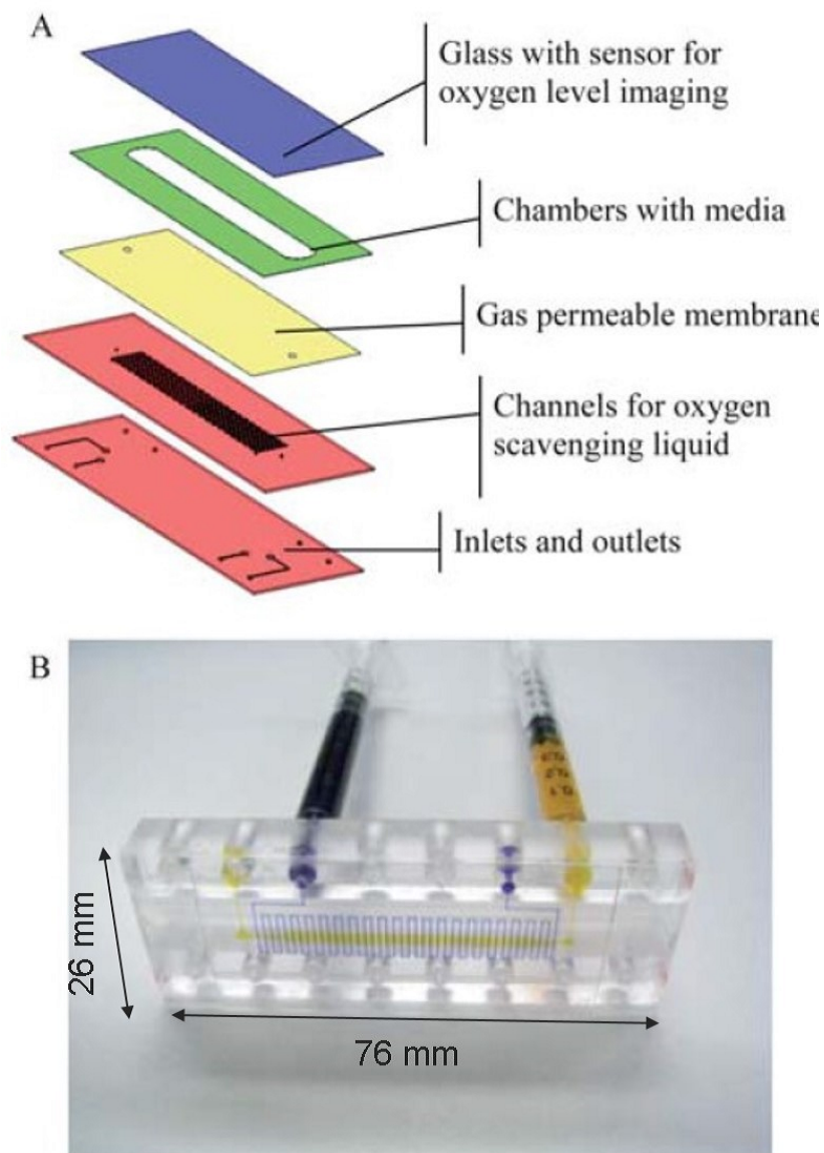


図 2.10 脱酸素溶液により酸素濃度勾配を形成可能な緑膿菌培養デバイス. A:デバイス構造, B:培養用流を黄, 脱酸素溶液用流路を青で染色したデバイス [Skolimowski 2010].

ると同時に養分や代謝物も動脈側から静脈側, すなわち酸素の高いほうから低いほうへ移動する. 肝臓内での尿素合成およびアンモニアの代謝経路を図 2.15 に示す. 門脈から供給されたアンモニアは一度動脈側で尿素合成のためにグルタミンとともに大部分が代謝される. この時血中に残ったアンモニアは, 静脈側でグルタミン合成酵素により代謝され, 静脈側で失ったグルタミンを補填するのに使われる. 物質の移動方向が生体内と逆である Sato らのデバイスを用いてこの代謝系を再現しようとする, 酸素の少ない Inlet 側でまずアンモニアが多く消費され, 対してグルタミンは多く合成される. グルタミンとアンモニアの balan



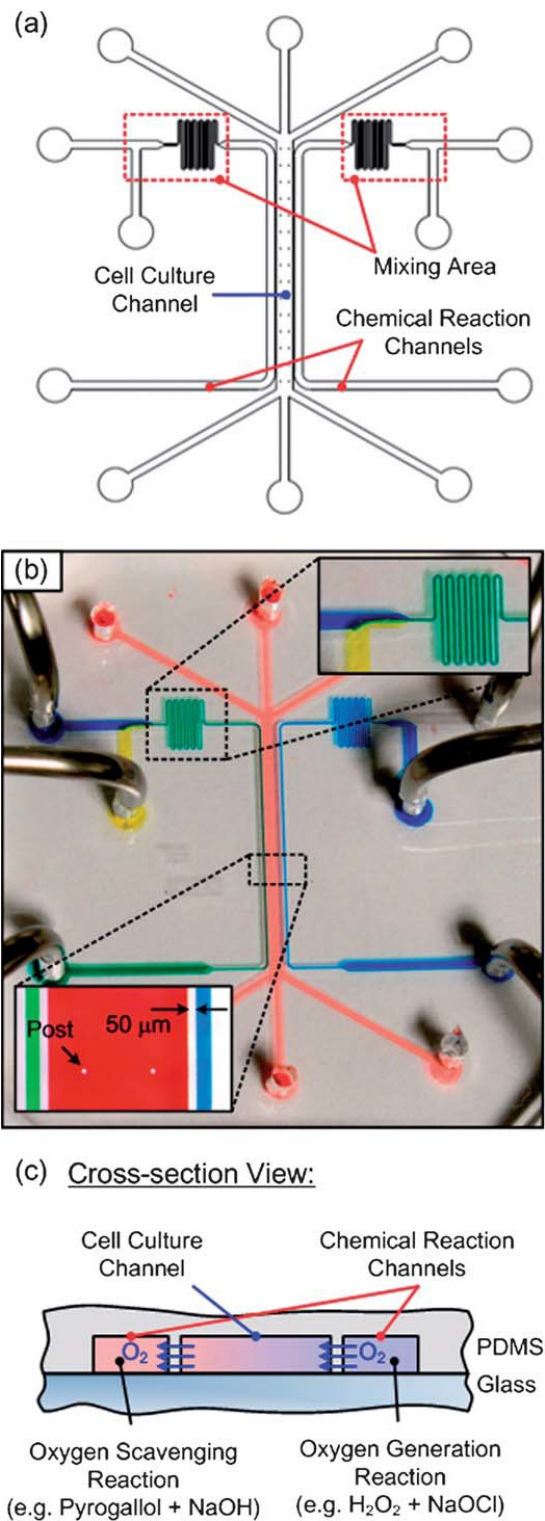


図 2.11 酸素濃度勾配を実装した lung on a chip. a:デバイス構造, b:デバイス写真, c: 流路断面図と酸素濃度勾配形成の仕組み [Chen 2011].

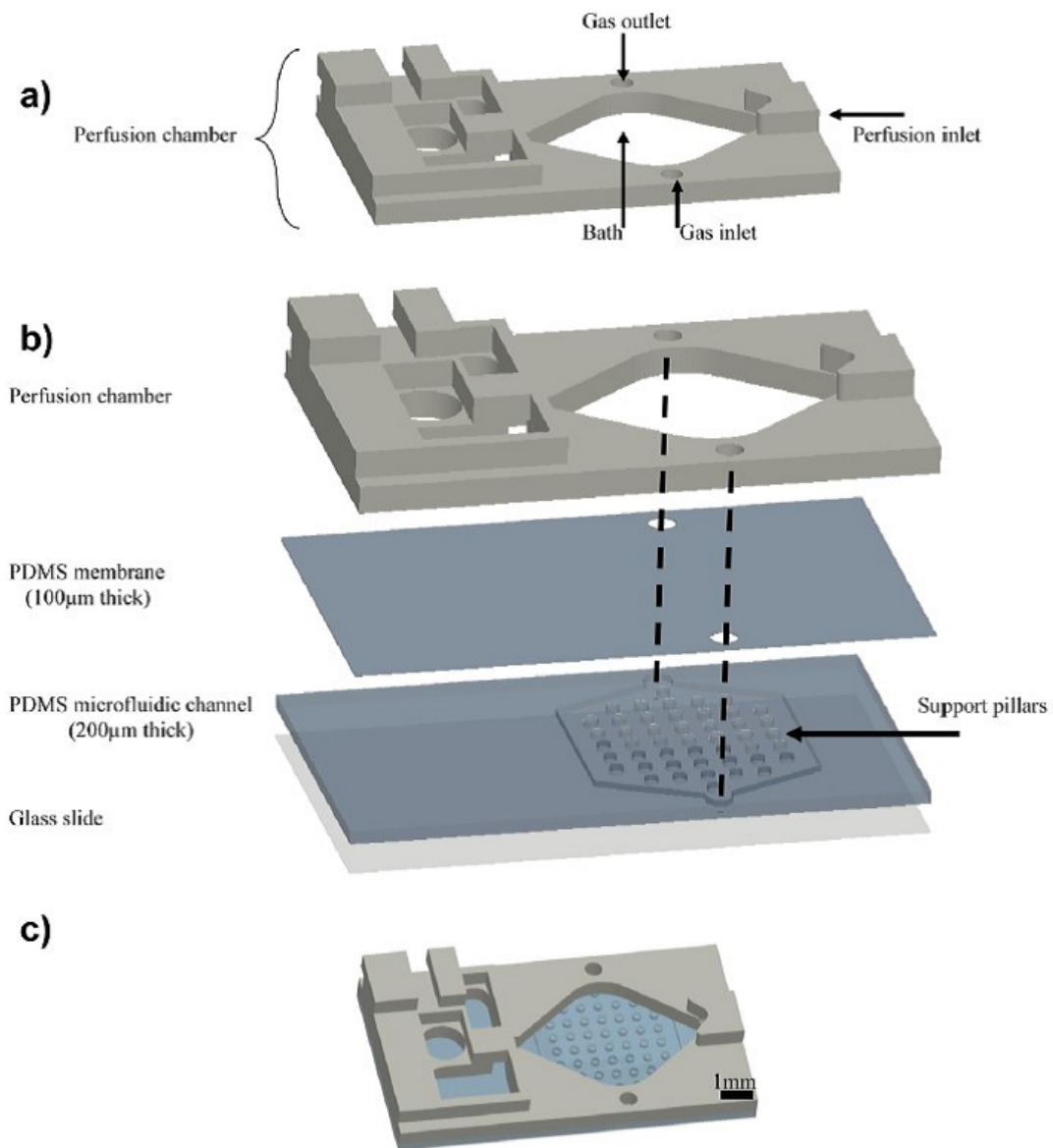


図 2.12 酸素ガスの灌流による酸素濃度勾配形成デバイス. a:酸素ガス灌流用流路の構造, b:デバイス構造, c:デバイス全体像 [Mauleon 2012].

スが崩れているため、Outlet 側では尿素回路が正常に機能しないことが考えられる。

対して、Allen らのデバイスは、細胞呼吸のみにより酸素濃度勾配を制御しており、灌流方向と酸素濃度が減少する方向が一致しているが、内部の酸素濃度を確認する機構が搭載されていないため、酸素濃度を参照しながら代謝機能について考察を行うことができない。また、Allen らの開発したデバイスは単純な構造をしており、内部の細胞は2次元的に培養されるうえ、ポリカーボネートを用いて作製されているため、この手法では、流路を複雑化して、より *in vivo* の環境に近い3次元培養に応用することが困難であることが考えられる。

肝臓内環境，とりわけ酸素濃度勾配と物質輸送の方向の両方を考慮したもので，細胞培養のみならず代謝機能の解析までを可能とするデバイスシステムは未だ知られていない。

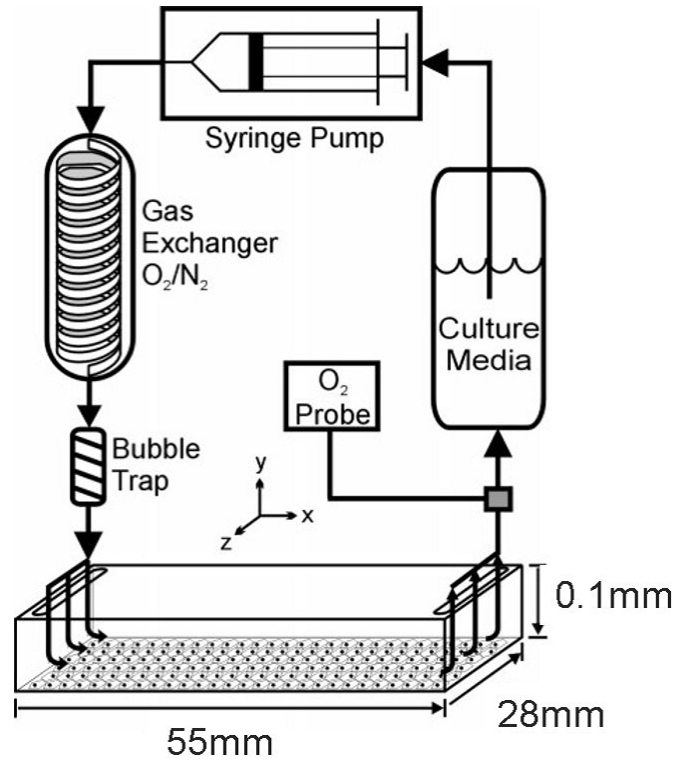


図 2.13 デバイス内で肝細胞の呼吸により酸素濃度勾配を形成する肝細胞培養デバイス [Allen 2002].

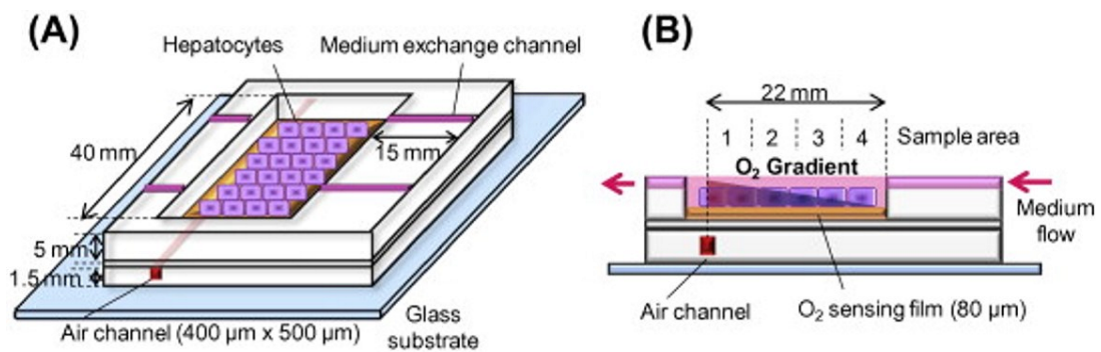


図 2.14 酸素ガス用チャンネルを用いて酸素濃度勾配を形成する肝細胞培養デバイス [Sato 2014].

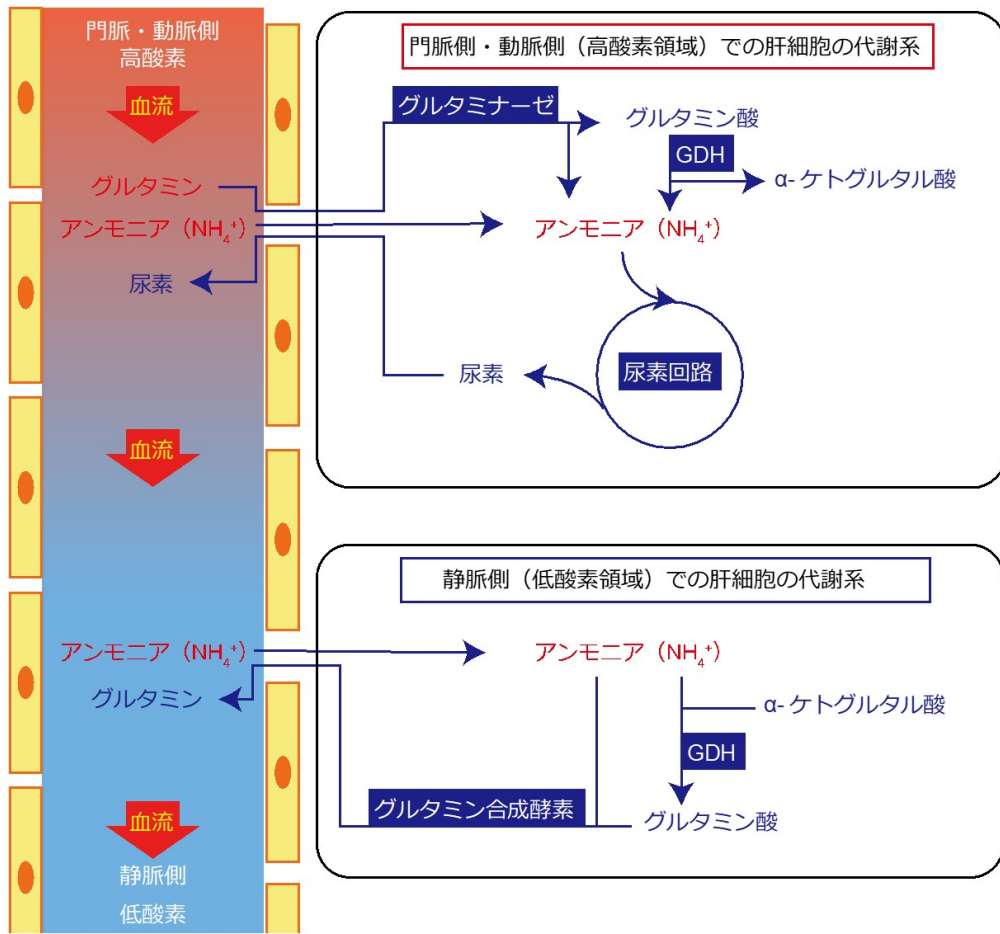


図 2.15 肝臓内での尿素合成およびアンモニアの代謝経路

## 2.3 肝代謝機能の主な評価方法

本研究では、酸素濃度勾配下で肝細胞を培養するのみにとどまらず、酸素濃度勾配に対する細胞の応答を評価可能なデバイスシステムの開発を目的としている。本節では、細胞の機能評価や環境応答に対する生物学的評価方法に関して触れ、本研究で開発をするデバイスに搭載するのに適した方法を検討する。

### 2.3.1 免疫染色

肝代謝機能の最も一般的な評価方法の一つに、免疫染色法が挙げられる。免疫染色法とは、抗体の基質特異性を利用し、対応する抗体を用いて観察対象の抗原を検出する方法である。細胞を固定し、抗原に対応する抗体（1次抗体）を結合させたのち、蛍光色素をラベルした2次抗体を1次抗体に結合させ、蛍光顕微鏡で観察する。励起波長および蛍光波長の違う蛍光色素を用いれば、核染色や細胞質の染色と併用して同時に観察することが可能であり、細胞の位置とタンパク質（抗原）の発生位置を視覚的にとらえることが可能である。新薬毒性試験において、有毒な試薬が解毒化されるか否かは、代謝産物を測定せずとも生細胞および死細胞を免疫染色することによって簡便に確認することが可能である。生細胞を緑色蛍光で染色する試薬 Calcein, 死細胞を赤色蛍光で染色する試薬 propidium iodide (PI) を用いて、実験前に細胞を両試薬で染色し、実験後に各蛍光の輝度分布を測定する。どちらか一方のみの試薬を用いることもある。図 2.16 はアセトアミノフェン (APAP) を投与しなかった場合 (Control) の肝細胞と APAP を 10 mM 投与した場合の肝細胞の生存率を、Calcein を用いて観察した例である [佐能 2015]。APAP を投与した場合、代謝される前の APAP により一部の肝細胞が死滅していることが確認されている。

### 2.3.2 Western blotting および PCR 法

#### Western blotting および PCR 法による遺伝子発現解析

免疫染色では、励起光の種類を考慮すると、一度に観察可能なタンパク質は4種類程度までになる。さらに多くのタンパク質を一度に観察したり、遺伝子発現レベルでの評価を行いたい場合に適した方法として、Western blotting および Polymerase Chain Reaction (PCR) 法が挙げられる。いずれの場合も、まず、細胞を回収し、破壊してセルライセートを調製する。セルライセートを電気泳動させ、特定の遺伝子の発現量を確認するのが Western blotting、遺伝子を増幅させてから電気泳動を行い、かつ複数の遺伝子解析を可能にしたものが PCR 法である。PCR 法ではサーマルサイクルを用いて遺伝子を増幅させるため、1細胞から解析可

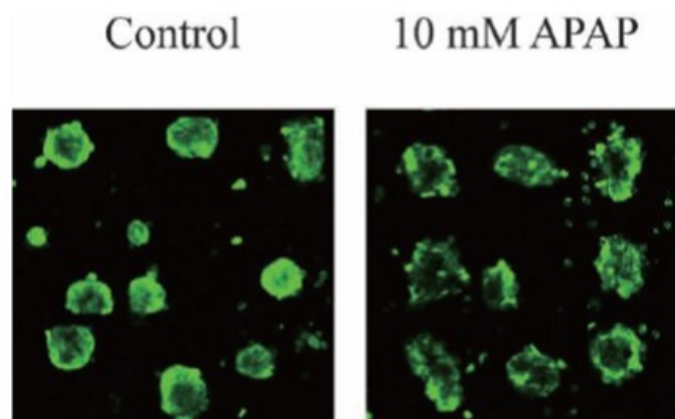


図 2.16 Calcein による生細胞の免疫染色結果. [佐能 2015]

能である.

Western blotting, PCR 法により培養肝細胞の遺伝子発現を確認した例をそれぞれ図 2.17, 図 2.18 に示す. 図 2.17 は Allen らの酸素濃度勾配を考慮したデバイスにおいて, 肝細胞が高酸素条件の時に Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), 低酸素条件時に Cytochrome P450 2B (CYP2B) を多く発現していることを示す. これは Monga により報告された *in vivo* における各遺伝子の発現条件と一致している [Monga 2011]. 図 2.18 は特定の培養条件下における肝細胞において, 各 Cytochrome P450 遺伝子 (CYP 遺伝子) の発現量を測定したものである. CYP 遺伝子は一部を除いて大半が低酸素条件で発現することが報告されている [Baudoin 2014].

#### マイクロ流体デバイスにおける局所的細胞回収方法

マイクロ流体デバイス内で培養した細胞に対して, 電気泳動法および PCR 法を用いた遺伝子発現解析を行う場合, デバイス内の細胞を回収する必要がある. 通常の細胞回収方法では, トリプシンやアキュターゼなどのタンパク質分解酵素をデバイス内に満たして細胞を回収する方法が一般的だが, マイクロ空間を利用して, デバイス内の特定の部位に存在する細胞のみを局所的に回収する研究が進んでいる.

マイクロ流体デバイスにおいて, マイクロスケールの幅の流路に 2 種類の液体を流入すると, 拡散よりも流体の粘性が大きく働き, 液体が混合せず層流が生じる. これを利用し, 流路の一部分のみにおいて細胞を回収することができる. Villa-Diaz らは, 図 2.19 に示す Y 字型流路の一方に 0.05% Trypsin-EDTA を, もう一方に培養液を流入することで流路の片側の細胞のみを回収することに成功した. 図 2.19 において, 流路内の流速はおよそ 25  $\mu\text{L}/\text{min}$

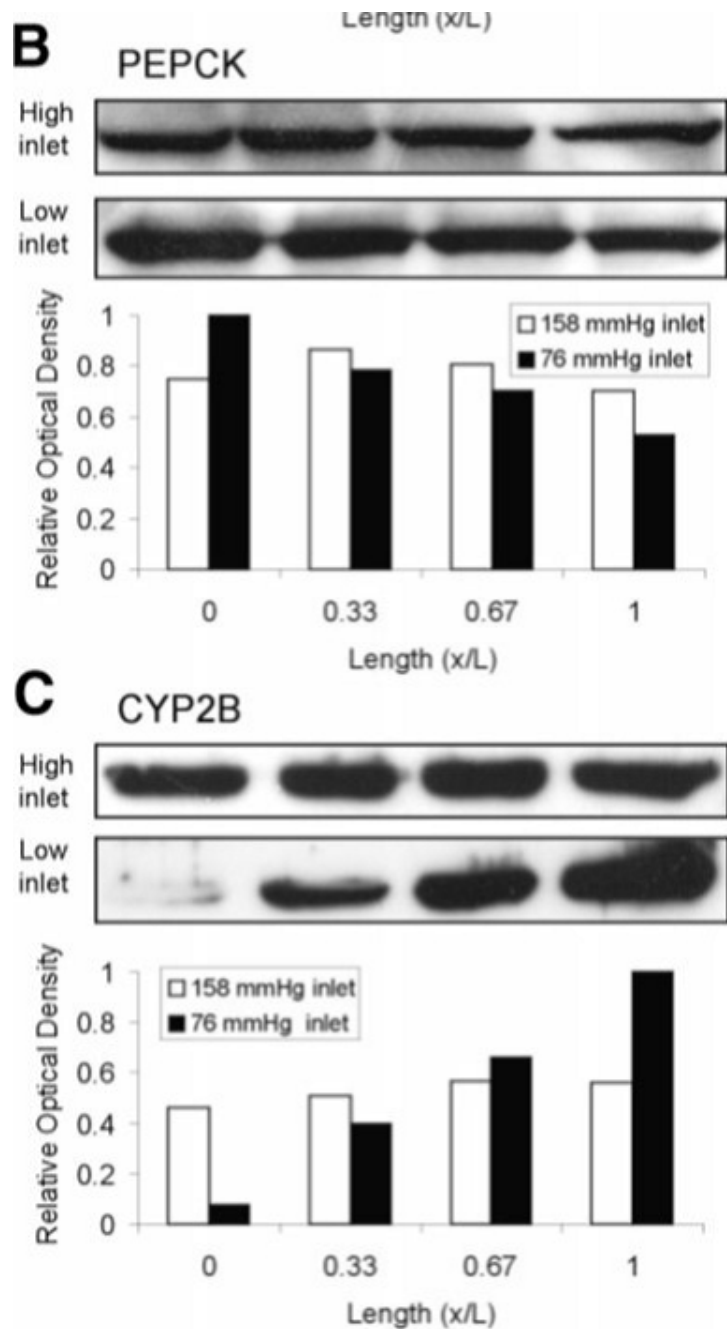


図 2.17 電気泳動法による高酸素条件と低酸素条件での遺伝子発現量における差の検出.  
[Allen 2002]

であり、およそ 60 秒で細胞の回収が完了することが明らかになった [Villa-Diaz 2009].

一方で、上下 2 層の流路を用いて、上下方向の薬剤の拡散を利用し、局所的に細胞を回収する方法が Kraus らにより報告されている [Kraus 2006]. この方法では、図 2.21 に示す構造のデバイスを用いて、上側の幅の狭い流路に薬剤を非常に遅い流速で流し、下側の幅の広

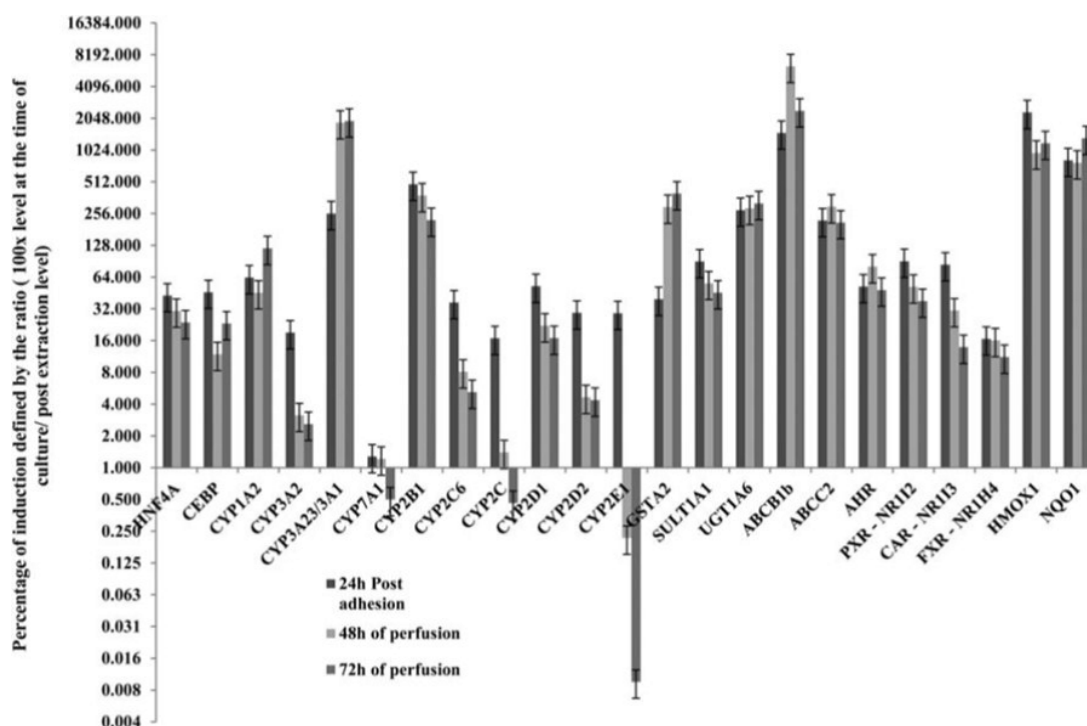


図 2.18 PCR 法による肝細胞の遺伝子発現測定結果. [Baudoin 2014]

い流路で培養液を速い速度で流すことで、下側の流路の流れに沿って薬剤が線状に作用する仕組みとなっている。図 2.22A は Kraus らのデバイスにおいて、試薬を  $1 \mu\text{L}/\text{min}$ 、培養液を上から 100, 80, 60, 40, および  $20 \mu\text{L}/\text{min}$  で流した場合の試薬の流れを示す。また、図 2.22B は試薬  $1 \mu\text{L}/\text{min}$ 、培養液  $60 \mu\text{L}/\text{min}$  条件において観察された蛍光強度を流れ方向に複数個所で観察し重ねたもので、縦軸は蛍光強度、横軸に中心部からの距離を表す。試薬として染色液を流した場合、下側の流路を流れる培養液の流量が少ない程、流路底部まで染色液が拡散し、細胞がよく染色されることが報告されている (図 2.22C)。Kraus らは本方法で細胞染色を行っているが、染色液をトリプシンで代用することで局所的細胞回収に応用可能であることが示唆される。

### 2.3.3 酸素濃度勾配条件下での肝代謝機能の測定に適した評価方法

PCR 法, Western blotting を用いる方法においてはデバイスに細胞を回収する機構が必要である。一方, 免疫染色で評価するためには, デバイスが蛍光顕微鏡で観察可能な形状, および明視野画像と蛍光画像を比較評価可能な形状をしている必要がある。本研究では, デバイス内で酸素濃度勾配を形成し, その中で肝代謝機能の多様性を再現・確認する事を目的としている。従って, 同デバイス内の酸素濃度条件の違う複数の場所において肝代謝に差異が



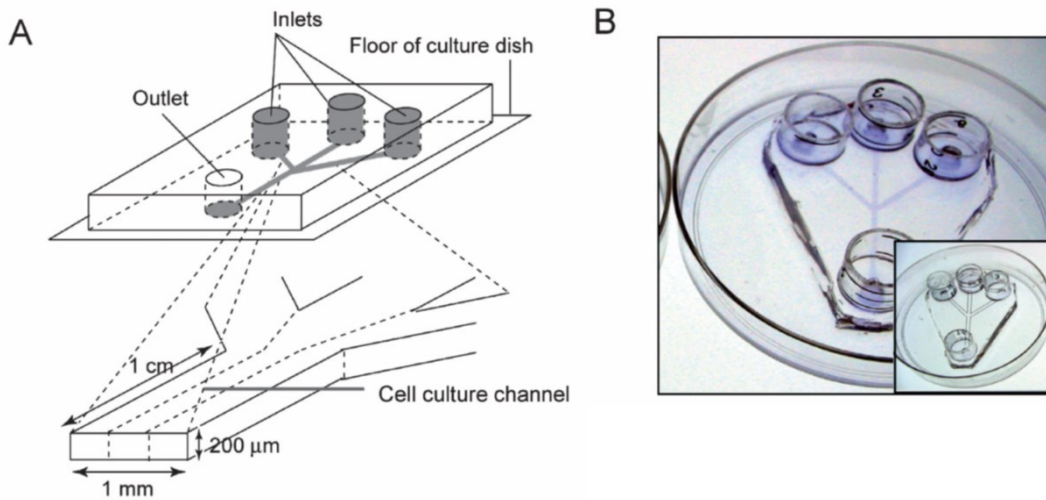


図 2.19 Y 字流路により層流を用いて細胞を局所的に回収するデバイス構造. A: デバイス構造, B: デバイス外観. [Villa-Diaz 2009]

見られることを確認する方法が求められる。免疫染色は簡便であり、デバイス全体を蛍光観察することができれば、蛍光の強弱をデバイス上の位置および酸素濃度と関連付けて評価することで肝代謝の差異を確認できるため、免疫染色法は本研究で開発するデバイスシステムに組み込むことに非常に適していると考えられる。

また、次に実用的な評価方法として、Western blotting よりも簡便である PCR 法があげられる。細胞を回収する機構が必要であるが、免疫染色よりも詳細に、かつ一度に複数の肝代謝を評価することが可能であるため、この方法も無視できない方法である。従って、免疫染色を行った際に、より詳しい解析が必要となったときのために、再実験用に、局所的に細胞を回収可能な機構を搭載したデバイスの開発をも考慮することが望ましいと考えられる。デバイス内で酸素濃度勾配を形成し、その中で肝代謝機能の多様性を確認するには、同デバイス内の酸素濃度条件の違う複数の場所において肝代謝に差異が見られることを確認する方法が求められる。従って、同じ酸素濃度の部分の細胞を回収することが必要であり、酸素濃度勾配ができる方向と垂直に細胞を回収する必要がある。流路に沿って酸素濃度勾配が形成される場合、流路方向に細胞を回収するための、Y 字流路を用いた方法は用いることが出来ない。従って、酸素濃度勾配が形成される流路の上部にトリプシン用流路を直交するよう配置して、上下方向の拡散を利用した回収方法により細胞の回収を行うことのできる構造をとる必要がある。PCR 法を行う場合は、1 細胞から解析可能であるため、回収する細胞数は 1 細胞以上であればよいことが考えられるので、層流の幅は 1 細胞の幅である  $10\mu\text{m}$  で十分であることが示唆される [Sakai 2011]。

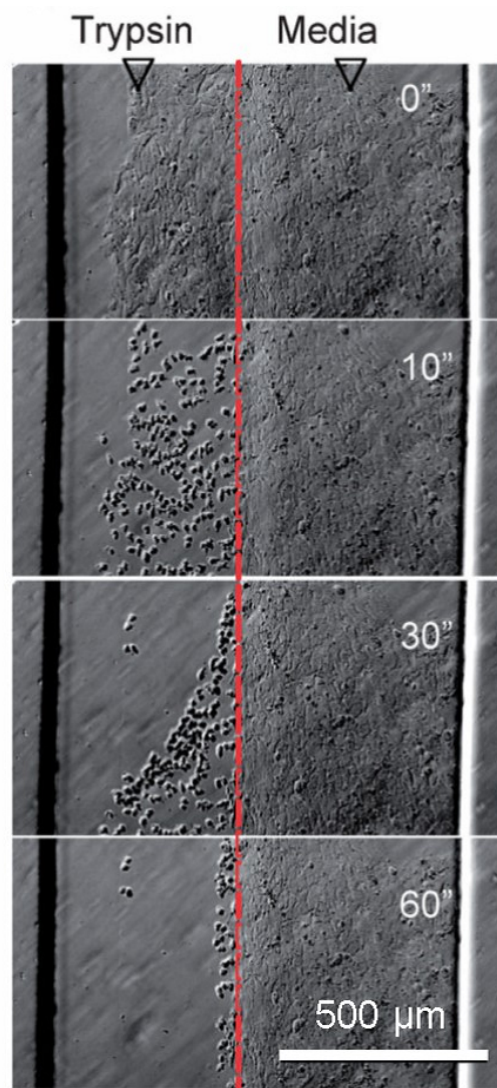


図 2.20 トリプシンによる局所的細胞回収のタイムラプスによる観察結果. [Villa-Diaz 2009]

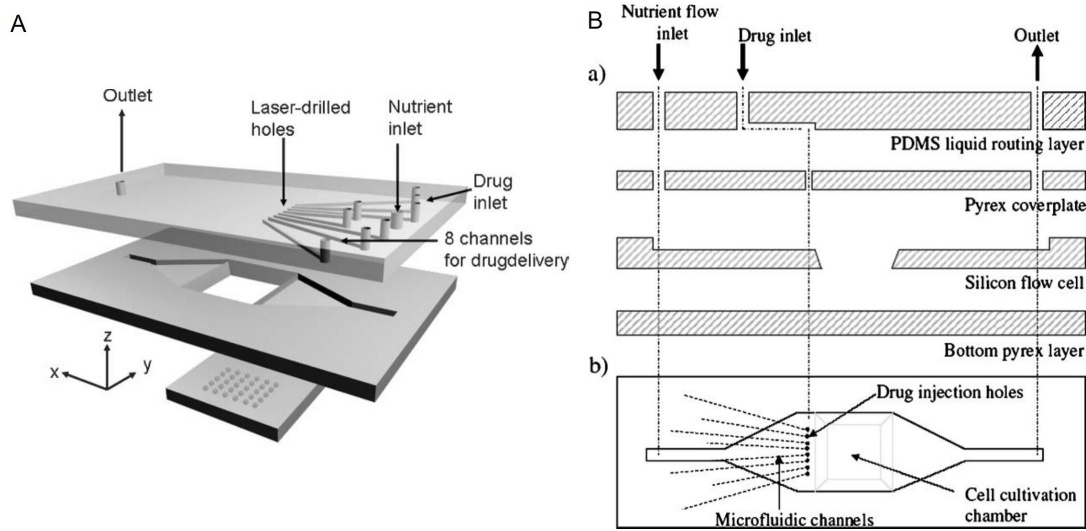


図 2.21 上下方向の拡散を利用して細胞を回収可能なデバイス構造. A:デバイス層構造, B:デバイス断面図と平面図. [Kraus 2006]

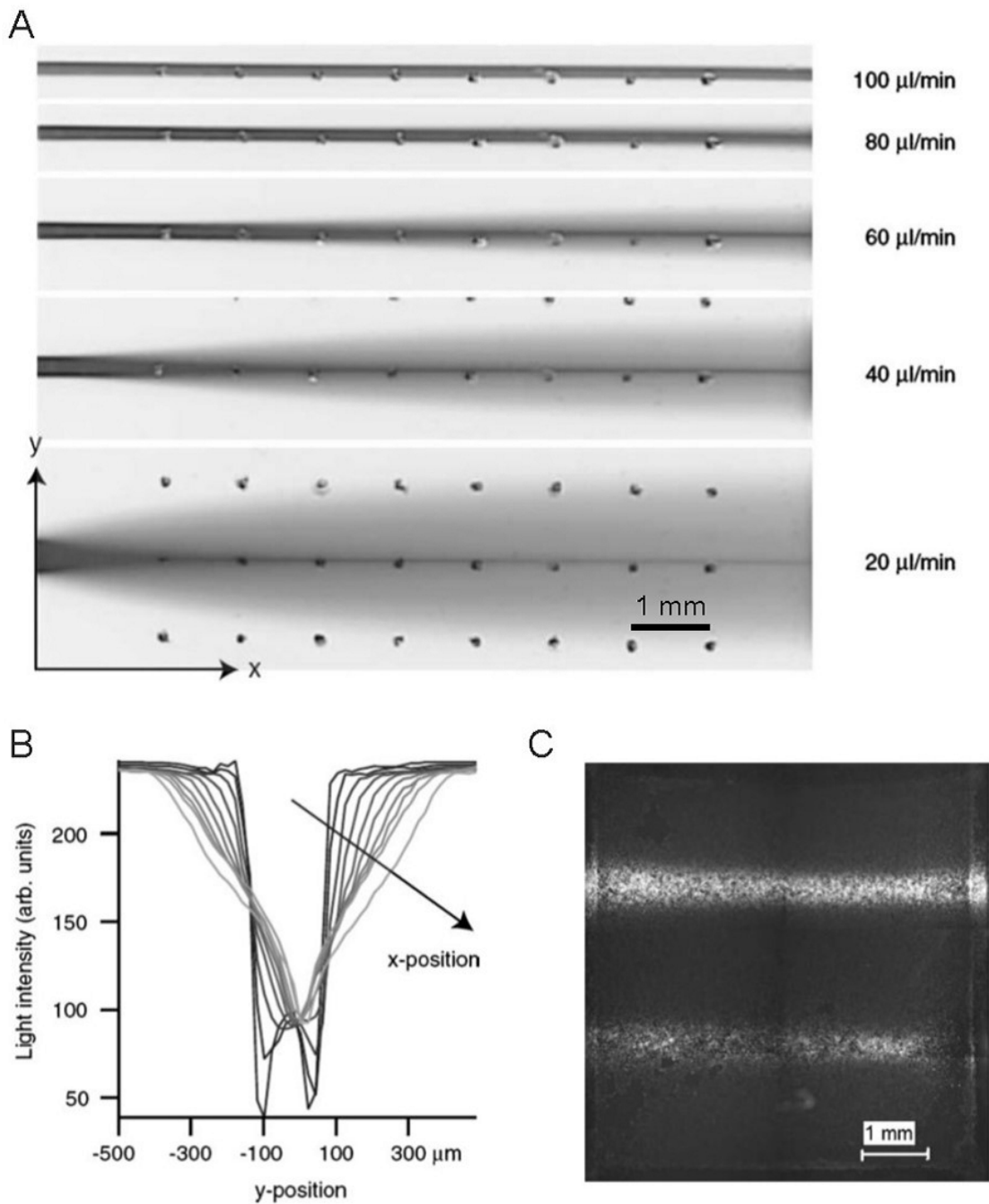


図 2.22 培養液の流量と試薬の流れの関係. A:デバイス上部から観察した場合の各流量条件における試薬の拡散の様子, B:試薬流量 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ , 培養液流量 60  $\mu\text{L}/\text{min}$  条件において蛍光試薬を流した場合の蛍光輝度, C:培養液流量 50  $\mu\text{L}/\text{min}$  条件 (上) と 100  $\mu\text{L}/\text{min}$  条件 (下) での細胞染色比較. [Kraus 2006]

## 2.4 Zonation を再現する *in vitro* 培養システムの提案

### 2.4.1 本研究における *in vitro* 培養システムの設計要件

本研究では、新薬開発における *in vitro* 試験方法に応用可能なデバイスシステムを作ることとを目的としている。前章で述べたように、新薬の効能を調べるには薬剤に対する肝機能の応答を見る必要があり、動物実験の代替法となる試験方法を *in vitro* で行うためには、*in vitro* において *in vivo* 同様の肝機能を再現する必要がある。そのためには *in vitro* において *in vivo* 肝臓内環境および zonation を模倣することが可能な肝細胞培養システムが必要であると考えられる。そこで、微小環境の制御に長けていると同時に、ハイスループット性が高く新薬開発における試験方法として実用性があると考えられるマイクロ流体システムを採用する。また、肝細胞の代謝機能に酸素濃度勾配が影響していると考えられることから、肝臓内環境においても特に酸素濃度勾配を再現可能なデバイスを設計する必要がある。酸素濃度勾配のマイクロデバイス内再現方法に関して、ガス交換膜を通して酸素を流入または吸収するといった、人為的な方法で酸素濃度勾配をマイクロ流路内に形成している方法では、細胞の呼吸による酸素消費については考慮していないか、培養用流路の培養液の流量を増やして、酸素濃度勾配への細胞呼吸の影響を無くしており、形成される酸素濃度勾配に一定の再現性が認められる。しかし、*in vivo* における肝臓は肝細胞の呼吸によって酸素濃度勾配が形成されていると考えられている。そのため、肝細胞の呼吸による酸素消費を考慮し、それを用いて酸素濃度勾配を形成するシステムの方が、より *in vivo* 条件に近い酸素濃度勾配が形成しやすい可能性があり、*in vivo* における肝臓の環境を再現するという観点からは適していると考えられる。また、*in vivo* において、動脈から静脈にかけて、酸素濃度の低下とともに、養分量の低下と物質の運搬が行われるため、酸素濃度勾配と養分の移動や代謝される物質の運搬系とも連動させる系を作ることが望ましいと考えられる。また、本研究で開発を目指すのは、細胞を培養するだけでなく、細胞培養時の周囲環境による細胞の変化を解析するために、細胞の環境応答を可視化するデバイスシステムである。具体的には、形成された酸素濃度勾配によって酸素濃度の異なる部位が存在するが、その酸素濃度の異なる部位同士における肝細胞の遺伝子発現や生成されるタンパク質の量の差異を明確に可視化および評価可能であることが求められる。

以上のことから、以下に述べるようなデバイスシステムを提案する。

- 細胞呼吸により酸素濃度勾配を形成する
- 培養液灌流時に上流から下流に向けて酸素濃度が減少する酸素濃度勾配を形成する
- 内部の酸素濃度分布がリアルタイムで可視化評価可能である

以上の3点を満たしたもので、

1. 免疫染色法により細胞の環境応答を評価可能であるデバイスシステム
2. RT-qPCR法により細胞の環境応答を評価可能であるデバイスシステム

が2種類のデバイスが必要であると考えられる。

免疫染色法ではデバイス全体を視覚的に観察するため細胞一つ一つの位置関係を把握しつつ解析可能であるという利点があるが、画像処理を必要とし、ノイズ等の影響から定量的な分析を行うことが難しい。一方で、RT-qPCR法ではより詳細な解析を定量的に行うことができるが、一定量の細胞を回収した際に1細胞同士の詳細な位置関係がわからなくなってしまふ。また、細胞回収を行う場合、HepG2肝がん細胞株のように継代培養が可能である細胞に限られてしまう。以上から、本研究では免疫染色用のデバイスとPCR用デバイスの2種類を開発し、解析するタンパク質および遺伝子発現の対象と使用する細胞を考慮して、実験ごとにより適切なものをデバイスシステムに組み込み使用することを提案する。

### 2.4.2 免疫染色用デバイス・RT-qPCR用デバイス両者に共通するコンセプト

まず、デバイス内外の酸素交換を防ぐことが可能な肝細胞培養マイクロ流体デバイスを作製する。酸素交換を防いだ状態で灌流培養を行うことで、細胞の酸素消費によりInletからOutletにかけて酸素濃度が減少する。このシステムでは、灌流培養を行うだけで酸素濃度が減少する方向へ物質の輸送を行うことができるため、非常に簡易的な方法で肝臓内の酸素濃度勾配とそれに連動した物質輸送を再現できる。

デバイスの構成材料および酸素交換を防ぐ方法としては、空気を通さない材料を用いるか、ガラス等で密閉する方法があげられる。肝代謝の再現のためにデバイス内で形成すべき酸素濃度勾配の範囲は、*in vivo*での酸素濃度条件（静脈側：15~20 mmHg (0.7~0.9 ppm)、動脈側：45~50 mmHg (2.0~2.2 ppm))を踏まえて、15~50 mmHg (0.7~2.2 ppm)を含む必要があると考えられる。加えて、細胞培養環境における酸素濃度の調製や、勾配中の各酸素濃度条件にさらされる細胞数を細胞密度を最適に保ちつつ調整するには、細胞を培養する領域の面積を調整する必要がある。PDMS製マイクロ流体デバイスでは、マイクロ流路の高さ、幅、長さを変えることが非常に容易であるため、酸素濃度勾配の調整と各酸素濃度条件における細胞数の調整が非常に容易であると考えられる。3次元構造化も容易であるため、スフェロイド培養やカラーゲンサンドイッチ培養法と組み合わせることも理論上可能であり、より細胞培養環境に多様性を持たせることができる。また、*In vitro*において肝機能を発現させるためには、デバイス内で肝細胞に極性を持たせる必要があり、そのためには、

デバイスで肝小葉の帯状構造を模倣することが望ましい。PDMS を用いてフォトリソグラフィでマイクロスケールの流路構造を形成することで、肝小葉の微細な帯状構造を再現することができるため [Whitesides 2001]、PDMS 製のデバイスは将来的に物理的構造の模倣まで発展性があると考えられる。

しかし、内部の環境を独立させるという点においては、PDMS は微小構造を模倣するのに適しているが、ガス透過性が高いため [妹尾 1983]、デバイス全体を PDMS で作成すると、デバイス内外のガス交換を防ぐことが出来ず、酸素濃度勾配を制御することが困難である。一方で、ポリスチレンは 3D プリントやドライエッチングで微小構造を作ることが出来るが、フォトリソグラフィに比べて精度が低い可能性がある。そこで、流路部分を PDMS で作成し、作製したデバイスをガラスやポリ塩化ビニリデンなどのガス透過性の低いポリマーでコーティングすることで、内部の微細構造を保持しつつ外部とのガス交換を防ぐデバイスを作製可能であると考えられる。

また、細胞応答の評価方法に関して、デバイスをそのまま顕微鏡を用いて観察する方法と、細胞を回収して解析する方法が考えられる。顕微鏡を用いた観察による評価方法には主に免疫染色法などが、細胞を回収する方法には主に RT-qPCR 法などが存在する。いずれの方法を取る場合も、観察する細胞の位置および回収・評価する細胞の位置と、その領域における酸素濃度を細胞培養時にリアルタイムで測定可能にするために、デバイス底面に酸素センサを配置する。酸素濃度が低いほど蛍光する白金オクタエチルポルフィリン (PtOEP) 等の酸素感応性蛍光色素を用いたシート型のセンサを用いれば、デバイス内酸素濃度を蛍光輝度で表すことができるため、蛍光顕微鏡を用いて容易に 2 次元的にデバイス内酸素濃度を可視化可能となる [Montagne 2009]。

以上を踏まえて免疫染色により細胞の機能評価を行うデバイス案を図 2.23 に示す。また、必要に応じてデバイス上流に酸素濃度制御システムを設けることを考える。



図 2.23 免疫染色用デバイスのデザイン。

### 2.4.3 RT-qPCR 用デバイスにのみ必要な設計要件

細胞を回収し RT-qPCR を行う場合は、各遺伝子の発現量を定量的に解析可能であり、信頼性のある結果を得ることができる。遺伝子発現のレベルにおいて 1 細胞から解析が可能である上に、免疫染色法に比べて一度に解析できる遺伝子の種類が多いため、RT-qPCR 用に細胞を回収する機構を搭載したデバイスを別途提案する。前述の酸素濃度勾配形成方法を用いると、細胞培養流路に沿って酸素濃度勾配が形成されるため、酸素濃度の異なる部位の細胞を比較するためには、細胞培養流路と直交する方向に細胞を回収する必要がある（図 2.24）。そこで、新たに細胞培養用流路の上に細胞回収用流路を直交させ、Kraus らが提示した PBS のシースフローを用いて試薬の拡散を防ぐ方法を応用し [Kraus 2006], Trypsin などのタンパク質分解酵素の流れを酸素濃度勾配の形成方向と直交方向に形成することを試みる（図 2.25）。

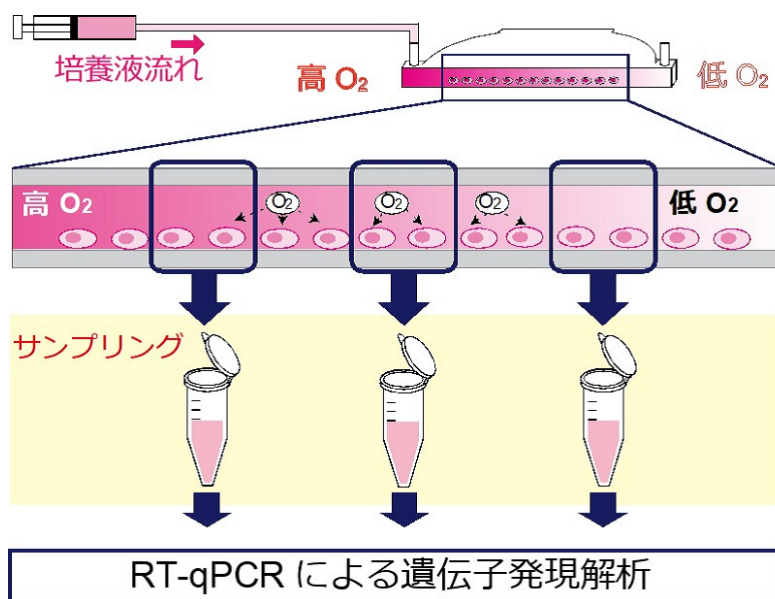


図 2.24 酸素濃度勾配下で培養した肝細胞について、局所的に細胞を回収し PCR 解析をするコンセプト。



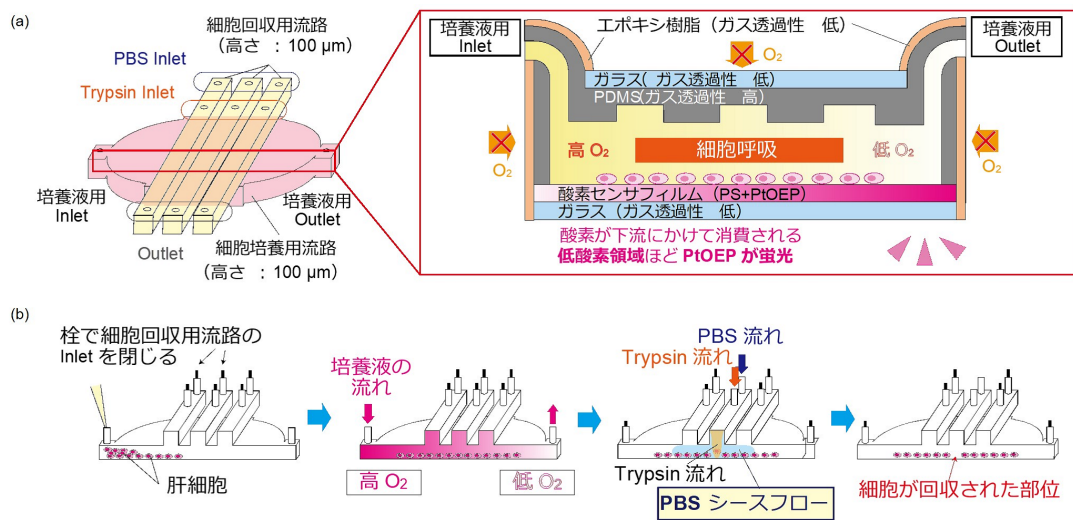


図 2.25 局所的細胞回収が可能な PCR 用デバイス. a: デバイス構造の概略図. b: 局所的細胞回収の手順と仕組み.

## 2.5 結言

本章では、マイクロ流体デバイスの生体内環境模倣への適正について具体例とともに述べた後、肝細胞培養マイクロシステム、酸素濃度形成マイクロシステムを紹介した。次に、培養細胞の環境応答や機能評価を行うために考慮しなくてはならない生物学的評価方法について触れた。最後に、以上を踏まえて、本研究で提案する肝細胞培養システムの概要と設計要件を説明した。

次章では、細胞培養デバイス内での酸素濃度の制御方法と、デバイス内酸素濃度の計測システムに関して、既存の方法を踏まえて本デバイスに応用可能な手法を考察する。

---

## 第3章

# デバイス内酸素濃度の制御方法と計測方法

---

3.1	緒言 .....	47
3.2	濃度一定の酸素を送り込むシステム.....	48
3.2.1	バブリングシステム .....	48
3.2.2	酸素濃度制御型マイクロ流体デバイス .....	48
3.3	酸素濃度制御システムの機能評価 .....	51
3.3.1	培養液流入時の酸素濃度制御システム .....	51
3.3.2	実験目的 .....	51
3.3.3	実験環境・実験手順 .....	52
3.3.4	結果・考察 .....	53
3.4	酸素濃度計測方法 .....	57
3.4.1	電気化学的方法.....	57
3.4.2	蛍光測定方法と酸素感応性蛍光材料.....	57
3.4.3	酸素感応性蛍光材料の蛍光原理.....	58
3.4.4	蛍光測定用センサの種類 .....	59
3.4.5	短所・長所をふまえた各センサに関する考察 .....	62
3.5	デバイス内における酸素濃度勾配の計測方法の検討.....	65
3.5.1	酸素感応性蛍光材料の種類.....	65
3.5.2	蛍光層のポリマーのガス透過性が酸素感応性蛍光材料の反応に 与える影響の検証 .....	66
3.6	酸素濃度一定条件におけるデバイス内酸素センサの蛍光強度とその分布 の評価.....	67

3.6.1	実験目的 .....	67
3.6.2	提案手法 .....	67
3.6.3	実験環境・実験手順 .....	67
3.6.4	結果・考察 .....	67
3.7	結言 .....	70

---

## 3.1 緒言

本研究では、デバイス内部で肝細胞を酸素濃度勾配下で培養するだけでなく、酸素濃度変化による肝細胞の代謝の変化を評価・考察することが可能なデバイスシステムを開発することを目的とする。実験に再現性を持たせ、信頼性の高い結果を得ることを可能にするため、内部に形成された酸素濃度勾配を制御することを考慮する必要がある。また、形成した酸素濃度勾配を制御するためには、デバイス内酸素濃度のモニタリングが必要不可欠である。従って、デバイス内部の酸素濃度を測定するセンサ機構を搭載する必要がある。そこで、本章では、細胞培養デバイス内の酸素濃度の制御方法および、酸素濃度を計測するためのセンサについて述べる。本章で述べる機構を肝細胞培養デバイスに組み込むことで、本研究の目指すデバイスシステムは実現可能となる。

## 3.2 濃度一定の酸素を送り込むシステム

デバイス内で形成される酸素濃度勾配の再現性を高めるためには、流入する培養液の酸素濃度を常に一定にする機構が必要であると考えられる。加えて、*in vivo*における酸素濃度勾配を模倣するには、*in vivo*と同じ酸素濃度、すなわち、酸素濃度の高い部分で45~50 mmHg (2.0~2.2 ppm)、低い部分で15~20 mmHg (0.7~0.9 ppm)の酸素濃度環境を形成する必要がある [Jungermann 2000]。そのため、培養液の溶存酸素濃度を前述の範囲に調整してからデバイスに流入させる必要がある。

### 3.2.1 バブリングシステム

バブリングシステムとは、デバイス流入口より手前において培養液に酸素又は窒素をパージすることで培養液中の溶存酸素量を調整してからデバイスに送り込むシステムである。灌流培養系におけるデバイス内部への酸素供給に関しては一般的にこの方法が取られる [Allen 2003]。密閉した容器に一度培養液を溜め、培養液中に酸素又は窒素を送り込む方法と、酸素又は窒素を満たした容器内に培養液を灌流させる方法の2種類がある。

溶存酸素量を調整するメカニズムを図3.1に示し、培養液中に酸素又は窒素を送り込む方法に基づいて説明する。溶存酸素濃度を上げたい場合は酸素を培養液中に送り込むことで最高で飽和酸素濃度まで溶存酸素濃度を高めることができる。また、溶存酸素濃度を下げたい場合、窒素を培養液中に送り込むことで窒素と酸素が結合し、窒素酸化物が生成する。窒素酸化物は培養液に溶けにくく、窒素酸化物となった溶存酸素が培養液の外に出ていくため溶存酸素濃度が低下する。

### 3.2.2 酸素濃度制御型マイクロ流体デバイス

Funamoto らは酸素濃度を制御可能なマイクロ流体デバイスを開発した [Funamoto 2012]。本デバイスはPDMSのガス透過性を利用し、細胞培養部の隣にPDMSの薄い壁を隔てて酸素を送り込むことで細胞培養部の酸素濃度を調整可能にしている。

デバイス構造を図3.2に示す。図3.2において青色で示された流路に酸素0%又は21%のガスを送り込む。そして、0.15 mmのPDMS壁を隔てた隣に図中赤色で示される培養液用流路を配置し、2本の培養液用流路の間に細胞を含むゲルを配置し、細胞を培養する。送り込むガスの酸素濃度によって、培養液中の溶存酸素量が変化し、細胞培養部の酸素濃度が変化する。また、2本のガス用流路に流すガスの酸素濃度の組み合わせを変化させることで、図3.3のような酸素濃度勾配を形成することが可能である。図3.3はシミュレーション

で計算された酸素濃度分布を表す。本デバイスでは、送り込むガスの酸素濃度と、流路内部に挟む PC フィルムの有無によって、細胞培養部の酸素濃度を 0% ~ 21% の範囲で調節可能であることが報告されている。

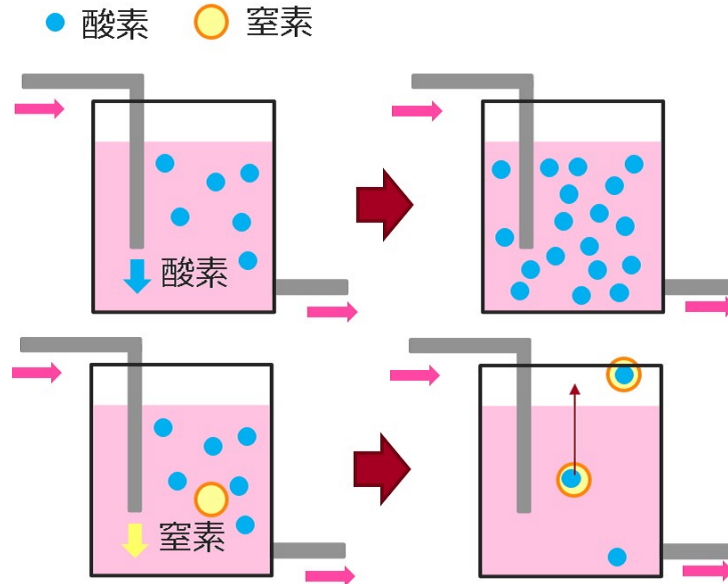


図 3.1 バブリングにより溶存酸素が調整される仕組み。

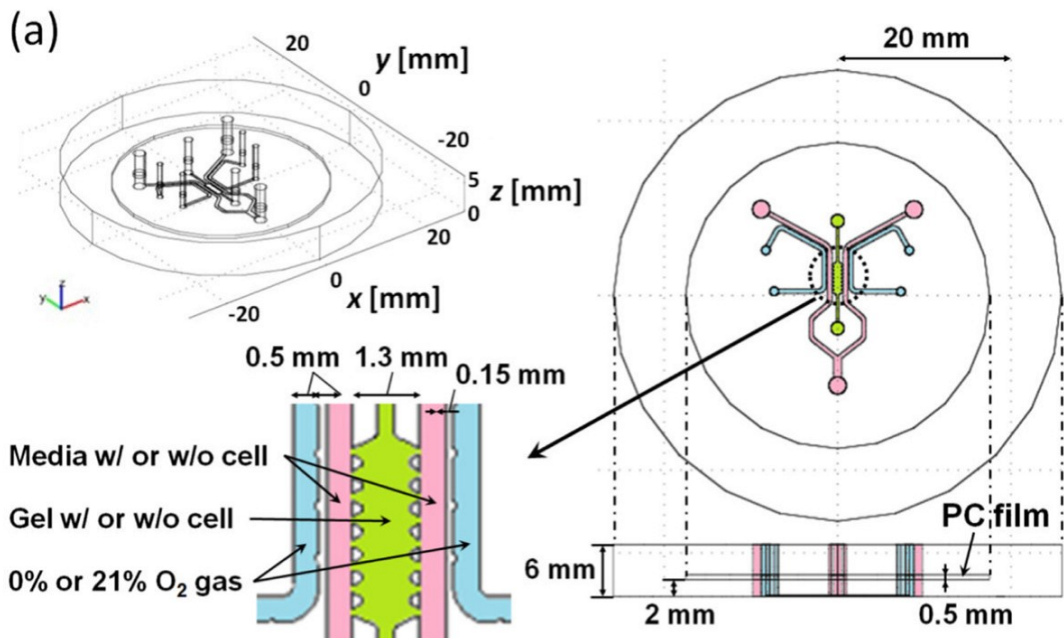


図 3.2 酸素濃度制御型マイクロ流体デバイスの流路構造。[Funamoto 2012]

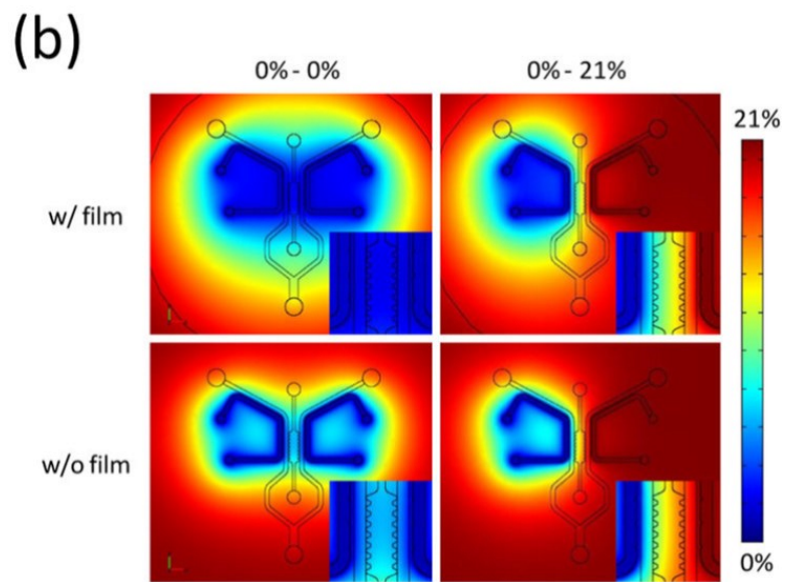


図 3.3 酸素濃度制御型マイクロ流体デバイスによる酸素濃度制御結果. [Funamoto 2012]



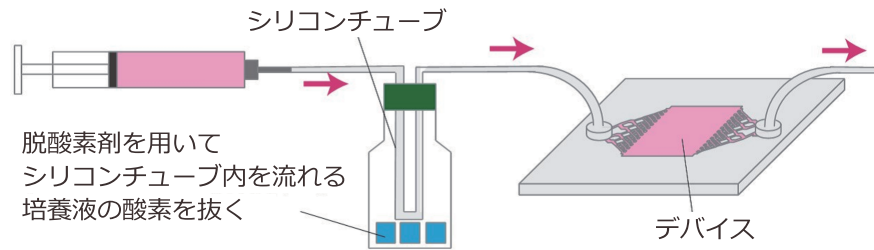


図 3.4 提案手法.

### 3.3 酸素濃度制御システムの機能評価

本研究では、本デバイス内で肝細胞を培養することで酸素濃度勾配を形成しその可視化をすることを目的としているが、将来的には、デバイス内で形成された酸素濃度勾配の肝細胞の代謝機能への影響を検証することを目標としている。代謝機能の検証には特定の酸素濃度勾配において複数回実験を行う必要があるため、デバイス内で特定の酸素濃度勾配を作成する方法に再現性が必要である。特定の酸素濃度勾配を再現性良く作成するためには、デバイスに流入する酸素濃度溶液を制御できるシステムの開発が必要となる。本節では前節で提案した酸素濃度制御法を用いて様々な酸素濃度の溶液を作成可能か検討する。

#### 3.3.1 培養液流入時の酸素濃度制御システム

培養液流入時の酸素濃度制御システムの設計案を図 3.4 に示す。ガス交換性の高いシリコンチューブを脱酸素剤を詰めた瓶の中に通し、そのチューブの中に培養液を通すことでチューブ越しに脱酸素剤が培養液中の溶存酸素を吸収し、培養液の酸素濃度を低下させる。そして、脱酸素剤を詰めた瓶の中を通過する前後の培養液の濃度を比較測定し、培養液の流量、瓶の中のシリコンチューブの長さ、外径と内径の比と、培養液中の酸素濃度の変化の関係を明らかにする。用意する培養液の酸素濃度をあらかじめ測り、適切な流量、適切な太さと長さのシリコンチューブを用いて、本手法によって理想の培養液の酸素濃度まで濃度を下げて調整することが可能となる。

#### 3.3.2 実験目的

本実験の目的は、デバイスに流入する酸素濃度を制御するシステムの開発である。具体的には酸素濃度一定溶液を調整し、酸素濃度が低下した溶液を作成可能か実証する。そして、使用するシリコンチューブの長さで作成される酸素濃度の溶液の関係を評価する。

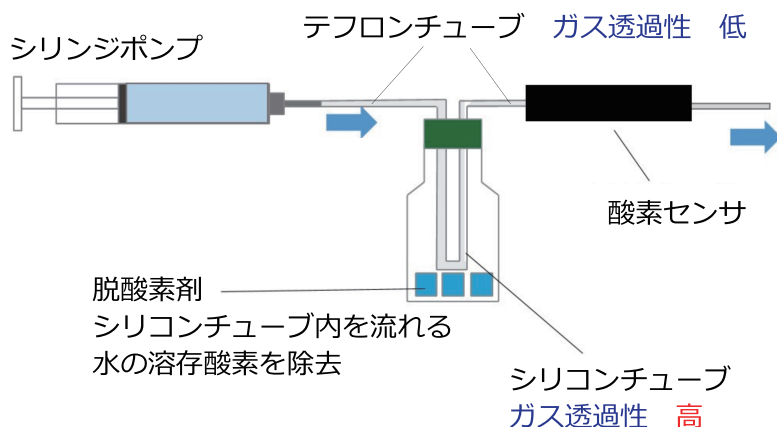


図 3.5 実験方法.

### 3.3.3 実験環境・実験手順

酸素濃度を低下させる手法を図 3.5 に示す。ガラス瓶の内部の空気を窒素で置換し、その中に脱酸素剤エージレス（酸素吸収剤セット A-500-50S，アズワン株式会社）を 3 個投入した。次に、ガス透過性の高いシリコンチューブ（SR チューブ 1 × 1.5，信越ポリマー株式会社）を瓶の中に通し、密閉性の高い硬質チューブ用ボトルキャップ（BL60608，株式会社アイシス）で瓶を密閉した。そしてチューブの中に流量 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  で水を通し、水の溶存酸素を低下させた。瓶の外に位置するチューブは、外部からの酸素の浸透を防ぐため、ガス透過性の低いテフロンチューブ（PTFE チューブ 14F0091，チューコフロー）を用いた。チューブが瓶から出てきたところに、蛍光式酸素センサ（Flow-Through Cells with Oxygen Sensor OXFTC，Pyro Science）（図 3.6）を取り付け、出てきた水の酸素濃度を、22  $^{\circ}\text{C}$  の室内でリアルタイムで測定し、酸素濃度が安定してから 60 秒間の値の平均値を記録した。水は十分に放置し室温と同じ 22  $^{\circ}\text{C}$  になったものを用いた。シリコンチューブの長さを 10 cm，20 cm，50 cm，100 cm と変化させ、それぞれの場合で瓶の中を通過した水の酸素濃度を測定し、比較した。使用した蛍光式酸素センサはチューブ状となっているフロースルータイプで、センサ内部に酸素濃度を測定したい溶液を流しながら蛍光をあてて測定する物を用いた。

使用したシリコンチューブ、テフロンチューブは共に内径 1 mm，外径 1.5 mm であった。実験環境を図 3.7 に示す。



図 3.6 使用した蛍光式酸素センサ。センサ内に溶液を流している状態で酸素濃度を測定する。

### 3.3.4 結果・考察

使用したシリコンチューブの長さで得られた酸素濃度の関係を図 3.8 に、使用したシリコンチューブの長さで得られた酸素濃度の減少量の関係を図 3.9 を示す。図 3.8 に関して、縦軸は脱酸素剤の瓶の中を通過した後の水の酸素濃度、横軸は使用したシリコンチューブの長さを表す。また、脱酸素剤の瓶を通過する前の水の酸素濃度をシリコンチューブが 0 cm として図中に表した。図 3.9 に関して、縦軸は水が脱酸素剤の瓶の中を通過する前後の酸素濃度の差、横軸は使用したシリコンチューブの長さを表す。図 3.8 から、脱酸素剤を入れた瓶の中に溶液を通すことで、溶液の酸素濃度が減少することが示された。また、図 3.9 からは、チューブの長さが長くなるほど酸素濃度の減少量は少なくなっていく、チューブの長さが 50 cm 以降の条件では、これ以上チューブを伸ばしても酸素濃度が 1.8 ppm 程度で変化がないことがわかった。

得られた結果から、提案手法を溶液に施すことで酸素濃度が低下した溶液を作成可能であることが明らかになった。また、チューブの長さが 50 cm 程度までは「チューブの長さが長い程溶存酸素量が低下する」という仮説通りの結果となった。しかし、減少する酸素量の変化はチューブを長くするほど小さくなり、チューブの長さが 50 cm より長くなると瓶を通過した水の酸素濃度はほぼ一定となり、仮定に反する結果となった。チューブの長さが 50 cm

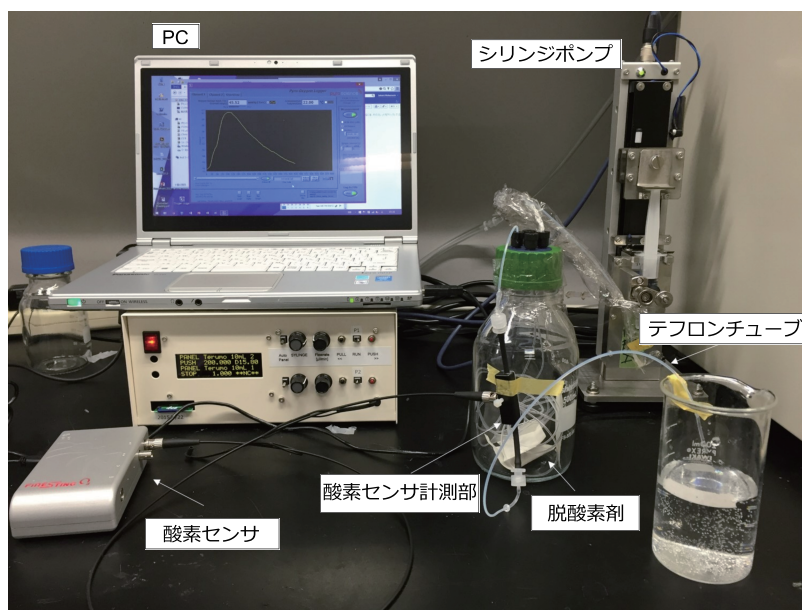


図 3.7 実験環境.

より長い条件において、一定となった酸素濃度は 1.8 ppm 前後であり、水の中の溶存酸素がすべて奪われることはなかった。原因として、チューブ、センサおよび両者の結合部からの酸素流入、センサ部での酸素拡散が考えられる。チューブについて、瓶の外のチューブはガス透過性の低いテフロンチューブを用いた。テフロンチューブとセンサの結合部はシリコンチューブを用いたが、同じくガス透過性の低いレジンでコーティングした。しかし、流量が 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  のため、テフロンチューブの低いガス透過性をもってしても微量の酸素が流入する可能性がある。また、使用したセンサを使用する上で適性な流量は 10~100 mL/min であり、実験で設定した流量 200  $\mu\text{L}/\text{min}$  はこれに比べて非常に遅い。そのため、センサ内を水が通過する時間が長く、その間にセンサ表面から内部へ酸素が浸透・拡散した可能性がある。以上の理由より、センサ内を通過するときの水に酸素が残留していたと考えられる。

酸素濃度勾配の可視化手法に関して、第3章では酸素感応性蛍光材料を含む蛍光層を設計する際に、PDMS 製の蛍光層は反応せず、PS 製の蛍光層のみ酸素濃度 0% 溶液に反応した。PDMS はガス透過性が高いため、外気に触れている部分から蛍光層内部に酸素が浸透し、蛍光層の発光を阻害したと考えられる。このことから酸素感応性蛍光材料を含むポリマーを蛍光式酸素センサとしてデバイスに組み込む際は、ガス透過性が低いポリマーを用いて作成する必要があることが明らかになった。

また、*in vivo* における酸素濃度勾配を形成するためには、デバイスの上流の酸素濃度すなわち流入する培養液の酸素濃度は肝小葉内部において最も酸素濃度が高い外周の酸素濃度

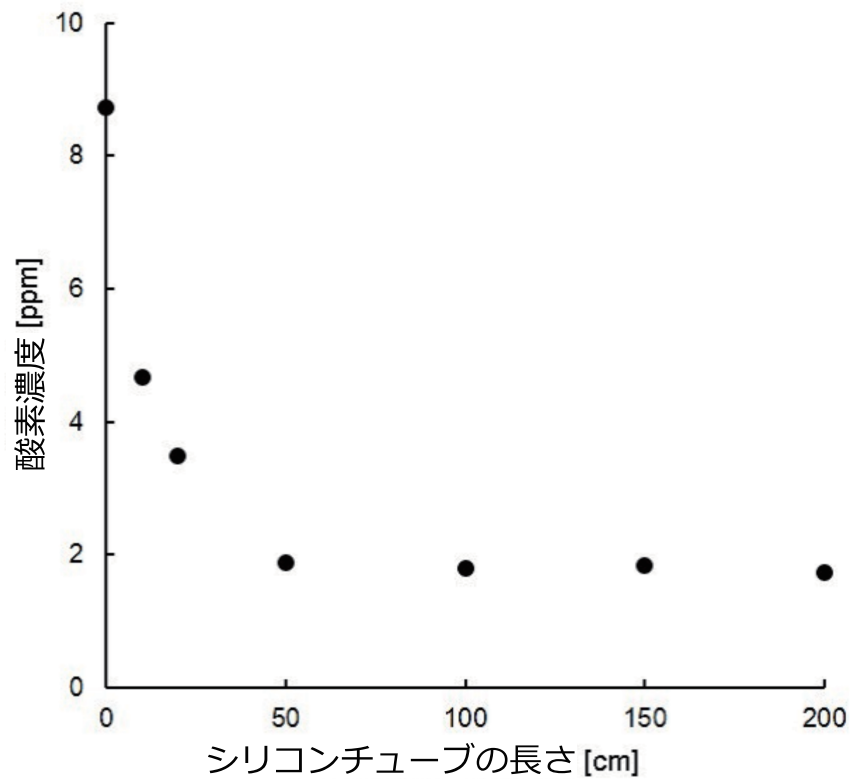


図 3.8 シリコンチューブの長さとお瓶の中を通過した酸素濃度の関係.

と一致することが望ましい。今回生成できた溶液の酸素分圧の範囲約 1.8~8.7 ppm であり、この酸素濃度の範囲は肝小葉外周の酸素濃度である約 2.0~2.2 ppm を含むため、本手法では *in vivo* における酸素濃度勾配を形成する条件を満たすと考えられる。

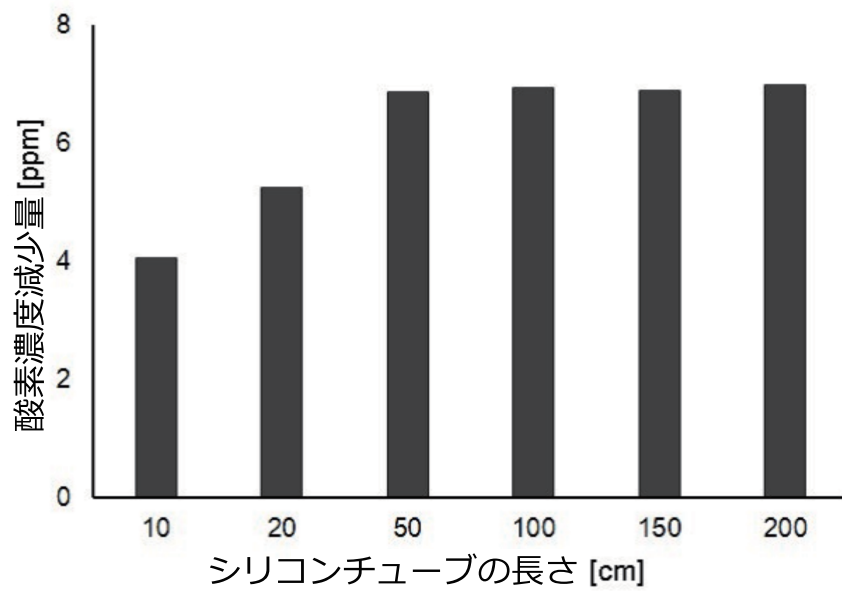


図 3.9 シリコンチューブの長さで瓶の中を通過した後の酸素濃度の減少量の関係.

## 3.4 酸素濃度計測方法

既存の酸素濃度計測方法をマイクロ流体デバイスに応用する際には様々な課題がある。例えば、サンプルの体積が小さいため、河川などの溶存酸素を測定する際に用いられるウィンクラー法を用いることは不可能である。マイクロデバイス内の酸素濃度を計測する方法として主に電気化学的方法と、蛍光測定方法の2種類がある [Oomen 2016]。

### 3.4.1 電気化学的方法

電気化学的方法で酸素濃度を測る一般的なバイオセンサとして、クラーク電極を用いた方法が存在する [Clark 1953]。クラーク電極方法では、酸素電極の電極部に飽和塩化カリウム溶液を満たし、白金と銀を用いた電極の間におよそ 800 mV の電圧を印加することで電氣的に酸素濃度の測定を行う。この方法を用いてクラークらは人工心肺内の酸素濃度のモニタリングに成功した。ただし、本手法では電極と酸素濃度を測定したい対象の間に、電解質などの電気伝導性を持つものが必要になり、測定中に電解質が分解・減少することから長期間の測定には不向きである。そのため、細胞培養系と組み合わせるのが困難であることが考えられる。また、酸素を測定する際に試料中の酸素を消費する必要があるため、測定サンプルを常に攪拌しておく必要があり、流速が小さい場合や無い場合においては正しい測定結果を得にくいという課題がある。特に灌流型のマイクロデバイスにおいては流路全体の平均的な酸素濃度が測れても流路内の局所的な酸素濃度を測定し比較するのには適さないことが考えられる。測定に適正とされる電極の大きさは直径 3 mm のプローブ型の電極であり、一般的にプローブ先端はポリテトラフルオロエチレン (PTFE) でコーティングされている。測定時には PTFE 膜全体に酸素が拡散し、PTFE 膜はタンパク質などが吸着しやすいため、マイクロ流体デバイスに本手法を応用するには分解能が低いという課題もある。

### 3.4.2 蛍光測定方法と酸素感応性蛍光材料

マイクロ流体デバイス内の酸素濃度の測定には、蛍光センサを応用することが可能である。サンプル中の酸素を消費しないためサンプルの流速が低い場合でも高精度の測定結果を得ることが可能な点、狭い領域内でセンサの個数を増やしたりセンサをシート型に加工することが容易であるため 1 点だけでなくデバイス全体の酸素濃度を測定することが可能となる点において、蛍光センサは前述のクラーク電極と比較してマイクロ流体デバイスへの応用に適していると考えられる [Brennan 2014]。一般的な蛍光式酸素濃度計では、酸素濃度を測定する部位に酸素感応性蛍光材料が塗られており、その部分に

励起光をあてて計測した蛍光強度から酸素濃度を算出している。酸素感応性蛍光材料とは、低酸素条件で蛍光する蛍光材料一般を指す。酸素感応性蛍光材料に関する研究はこれまでに多く報告されており、センサとして感度が高く、有毒な副産物を生み出さないため、細胞培養条件下で酸素を検知する方法として有用だと考えられている。これまでに細胞培養系で用いられている主な酸素感応性蛍光材料を表 3.1 に示す [亀有 2012] [Skolimowski 2010][Kim 2013][Montagne 2009][Dmitriev 2012][Mehta 2007]。現在幅広く使われている酸素感応性蛍光材料にはポルフィリン錯体が多く一般的な酸素センサとして開発が進んでいるのは Erythrosin B であり、Erythrosin B を含んだシリカゲルの励起波長と蛍光波長が Chan らによって明らかになった [Chan 2002]。

蛍光測定方法であれば、気体内液体内によらず測定が可能なため、細胞培養系との相性が高いが、細胞培養環境においてセンサを用いて酸素濃度を測定する場合、細胞にセンサを接触させるかできるだけ近づけておく必要がある [Kieninger 2018]。そのため、酸素感応性蛍光材料の毒性が細胞機能に影響を及ぼす可能性がある。また、励起光を当てる際に、生物学的組織に影響を与えてしまう恐れがある。

表 3.1 細胞培養系で過去に使用された酸素感応性蛍光材料一覧。 [Skolimowski 2010]

PtTFPP (Platinum(II)-5,10,15,20-tetrakis-(2,3,4,5,6-pentafluorophenyl)-porphyrin)	亀有ら2012, Skolimowski <i>et al.</i> 2010
PtOEPK (Platinum(II) octaethylporphyrinketone)	Kim <i>et al.</i> 2013
PtOEP (Platinum(II) octaethylporphyrin)	Montagne <i>et al.</i> 2010
PtCP-NCS (p-isothiocyanatophenyl-derivatives of platinum (II)-coproporphyrin-I)	Dmitriev <i>et al.</i> 2012
PPIX (Protoporphyrin IX)	Dmitriev <i>et al.</i> 2012
PdOEP (Palladium(II) octaethylporphyrin)	Skolimowski <i>et al.</i> 2010
Erythrosin B	Skolimowski <i>et al.</i> 2010
RTDP (Tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(II))	Mehta <i>et al.</i> 2006

### 3.4.3 酸素感応性蛍光材料の蛍光原理

まず、蛍光色素の蛍光原理を図 3.10 に示す。光が蛍光色素により吸収されたとき、その電子は励起され、静止状態から励起電子と呼ばれる最大のエネルギーレベルに移動する。このとき、蛍光色素は内部構造の変化を受け、吸収されたエネルギーの一部を熱の形で放出するため、1~10 ns 励起電子の状態が続いた後に緩和起電子と呼ばれるエネルギーレベルに落ち



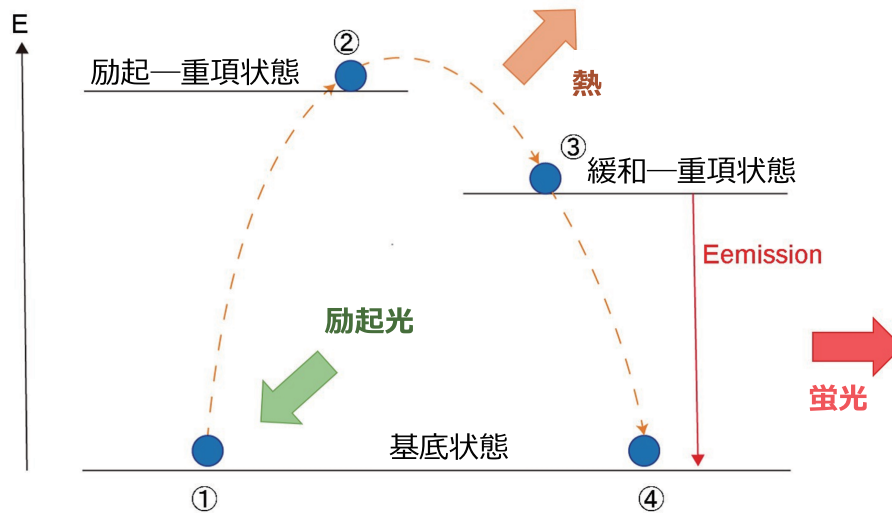


図 3.10 蛍光色素の蛍光原理.

る．ここから基底状態に電子が戻るときに放出する残りのエネルギー（図中の Emission : Em）が、蛍光顕微鏡で観察できる蛍光である．Em は蛍光色素中に吸収されたエネルギーより少ないため、蛍光色素の放出波長は、励起波長より常に長くなる．

酸素原子が酸素感応性蛍光材料の周囲に存在した場合、酸素感応性蛍光材料を励起させたときの Em が酸素原子に吸収されてしまうため、蛍光が放出されなくなる．そのため、酸素感応性蛍光材料は、周囲に酸素濃度が高い程蛍光が弱く、低い程強く蛍光する．その蛍光強度と酸素濃度の関係は Stern-Volmer plot で示されることが明らかになっている．Stern-Volmer relationship について、酸素濃度 0 の場合の酸素感応性蛍光材料の蛍光強度を  $I_0$ 、酸素濃度  $[O_2]$  の場合の蛍光強度を  $I$ 、Stern-Volmer 係数を  $K_{SV}$  とすると、

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[O_2]$$

の関係が成立する．なお、市販のセンサに使用されている Erythrosin B の Stern-Volmer 係数は Gillanders らにより明らかになっている [Gillanders 2004]．酸素感応性蛍光材料に関する研究はこれまでに多く報告されており、センサとして感度が高く、有毒な副産物を生み出さないため、細胞培養条件下で酸素を検知する方法として有用だと考えられている．

### 3.4.4 蛍光測定用センサの種類

蛍光測定方法には、(a) デバイス底面一面を薄い一様な酸素センサフィルムで覆う方法（シート型センサ）(b) デバイス底面にアレイ状に酸素センサフィルムを覆う方法（シート型センサ）(c) ニードルの先端に酸素センサフィルムを搭載し、蛍光ファイバー式のセンサ

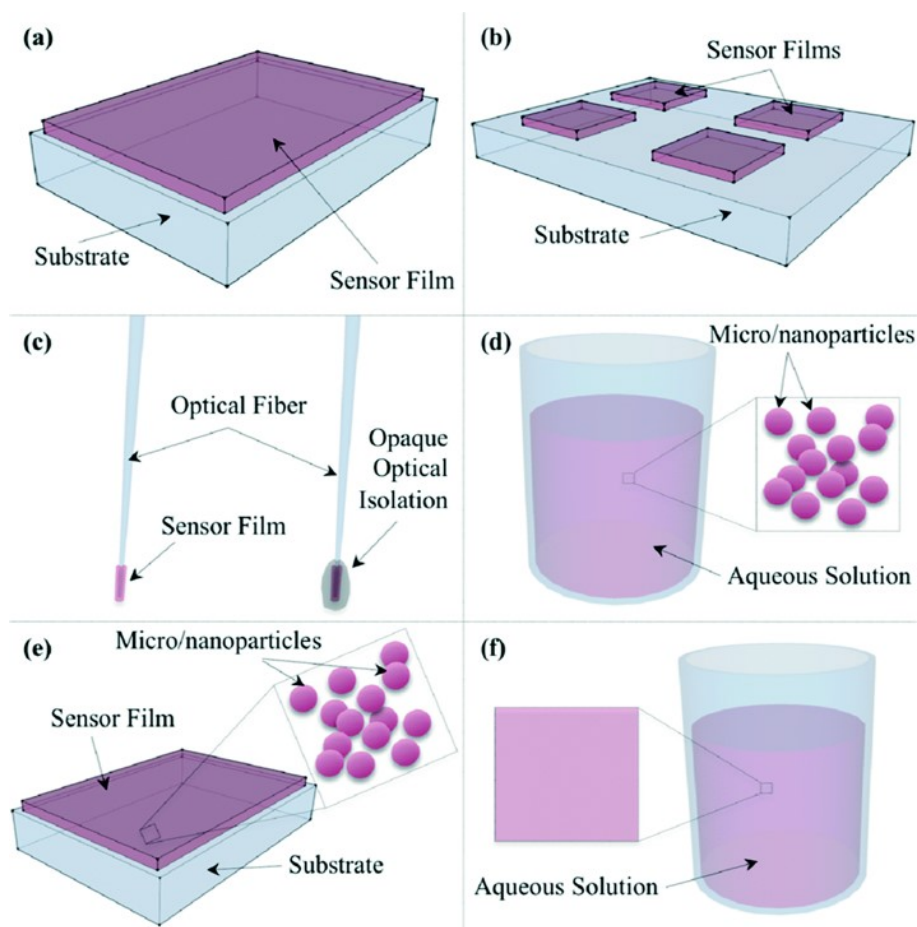


図 3.11 蛍光測定方法の種類 [Oomen 2016].

を作製する方法（ファイバペア型センサ）(d) 酸素感応性蛍光物質（マイクロ・ナノパーティクル）を混合した液体をセンサとして用いる方法（液体センサ）(e) 酸素感応性蛍光物質（マイクロ・ナノパーティクル）を混合したフィルムをセンサとして用いる方法（シート型センサ）(f) 酸素感応性蛍光物質を溶解させた液体をセンサとして用いる方法（液体センサ）6種類存在する（図 3.11）。a, b, e はデバイス全体の酸素濃度を測る方法であり，b は空間解像度を下げつつもセンサによる細胞へのダメージを減らす手法である。3 は一点の酸素濃度を測定するのに適しており，d, f はルセニウムの使用例であり，細胞を培養する流路内に直接流して用いるが，細胞の機能を観察する場合においては，センサに含まれる蛍光物質（ルセニウム）の細胞毒性や，細胞内に浸透するか否かを考慮する必要がある。d, e の方法はナノパーティクルを用いるため，センサ作成時にナノパーティクルがアグリゲートした場合に均一な蛍光輝度を発することができない恐れがある。

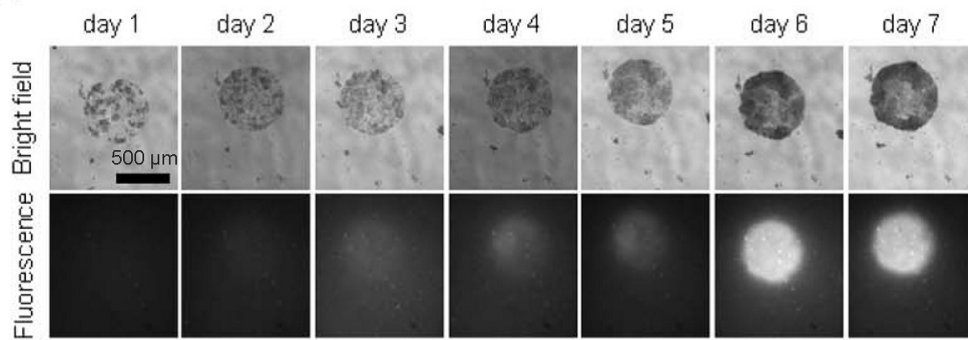


図 3.12 培養時間経過と酸素消費に反応する PtOEP [Montagne 2009].

### シート型センサ

Montagne ら, Komori らは白金オクタエチルポルフィリン (PtOEP) をポリスチレン (PS) に混合した層を作成し, その上に PDMS の薄膜, ポリカーボネート製の円型の仕切りの順に設置してウェルを作成し, その中で HepG2 細胞 (ヒト肝がん細胞株), ヒト受精卵を培養し, 酸素消費を蛍光強度により可視化した [Montagne 2009][Komori 2012]. 図 3.12 は, 培養日数の経過に伴い, 細胞を培養しているウェル内の酸素が消費され, それに反応した PtOEP の蛍光輝度が増していく様子を表す [Montagne 2009]. 図 3.12 中のスケールバーは 500  $\mu\text{m}$  を表す.

### ファイバペア型センサ

マイクロ流体デバイスの流路側面にファイバペア型蛍光センサを刺し, 流路内の蛍光輝度を測定することが可能である. 図 3.13 にデバイス構造, 図 3.14 に外観を示しているのは Gut on a chip の一例である [Kimura 2008]. このデバイスは流路側面にソケット状構造を作成し, そこにファイバペア型蛍光センサを差し込んで流路内を流れる蛍光色素を感知する.

### 液体センサ

バイオセンサとして細胞培養系に組み込むものとしては, Mehta らが RTDP を PBS に溶解させ, 培養液に混入させることで培養液中の酸素濃度を蛍光強度から測定し, C2C12 細胞 (マウス横紋筋細胞株) の酸素消費量を計算した [Mehta 2007]. 図 3.15 にデバイス構造を示す. 最上部の流路から液中の RTDP 濃度を 1 mg/mL に調整した培養液を流入し, その直下の流路で細胞を培養する. この 2 つの流路は繋がっており, RTDP が直接細胞と接触する. Mehta らの研究により, この条件において肝細胞は培養可能であることが報告されているが, 肝細胞の代謝への影響は検証されていない.

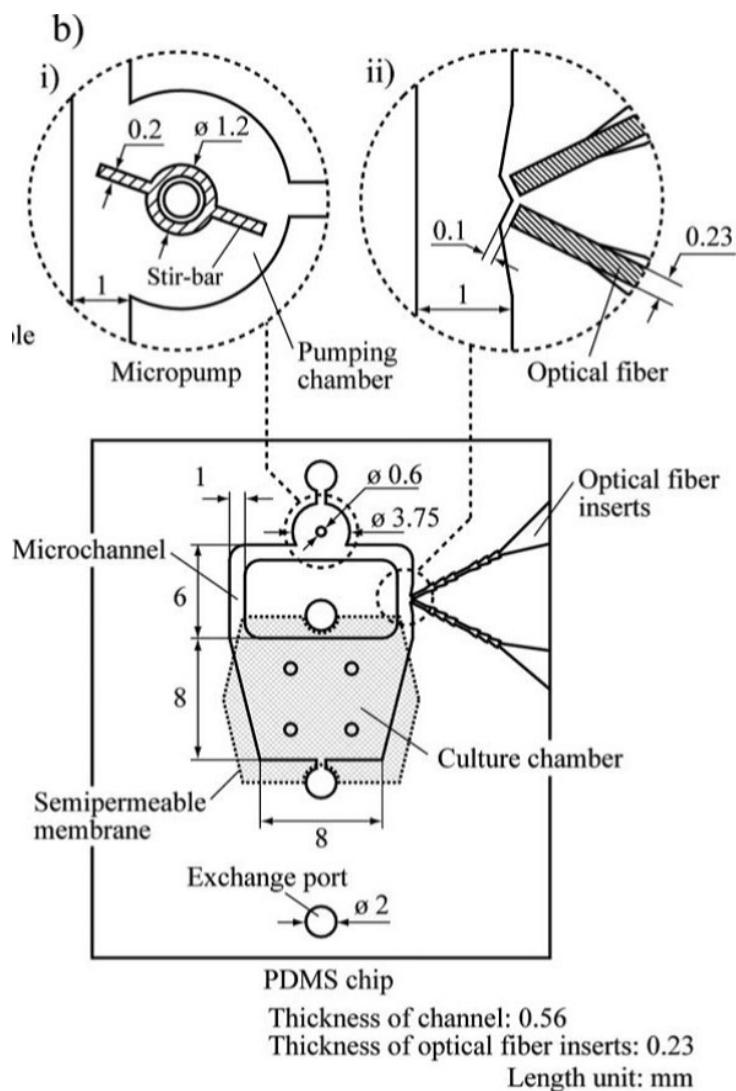


図 3.13 ファイバペア型蛍光センサをマイクロ流体デバイスに組み込んだ例 [Kimura 2008].

### 3.4.5 短所・長所をふまえた各センサに関する考察

前述の3種類のセンサの長所と短所を表3.2に示す。ファイバペア型は市販のセンサを埋め込むことができるため、酸素濃度を数値を用いて定量的に測定することができるが、デバイス内1点における酸素濃度しか測れないため、酸素濃度勾配を測定するには複数のファイバペア型センサが必要になる。また、デバイス全体の酸素濃度分布を測るのには適さない。一方、液体型センサは培養液と混合する必要があるため、酸素感受性蛍光材料の毒性や、肝代謝に与える影響の検証が必要となる。シート型センサは薄膜のため加工・接着が容易であり、流路底面に設置することでデバイス構造に関係なく2次元的にデバイス全体の酸

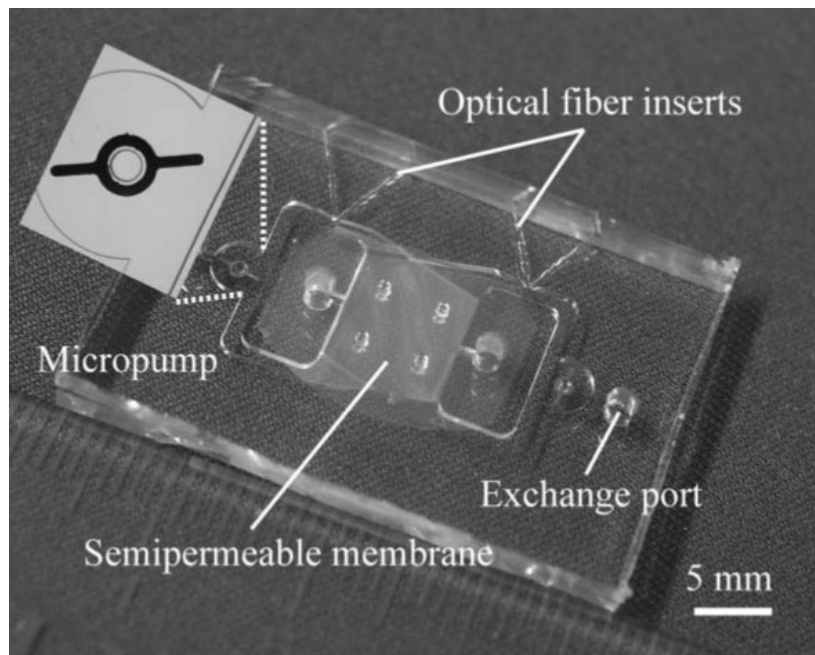


図 3.14 ファイバペア型蛍光センサを組み込むことのできるマイクロ流体デバイスの外観 [Kimura 2008].

酸素濃度分布を測定することが可能である。従って、肝細胞培養デバイス内の酸素濃度勾配を測定する条件では、シート型センサが適していると考えられる。なお、酸素感応性蛍光材料の毒性が細胞機能に影響を及ぼす可能性や、励起光を当てる際の、生物学的組織に影響を与えてしまう点に関して、本研究では、デバイス内酸素濃度の可視化を第一目的とする。電気化学的手法では、灌流培養系において流路全体の酸素濃度を測ることしかできず、局所的に酸素濃度を測定するには、細胞活性に多少影響があるといえど蛍光測定方法をとらざるを得ない。そのため、本研究では蛍光測定方法を採用する。

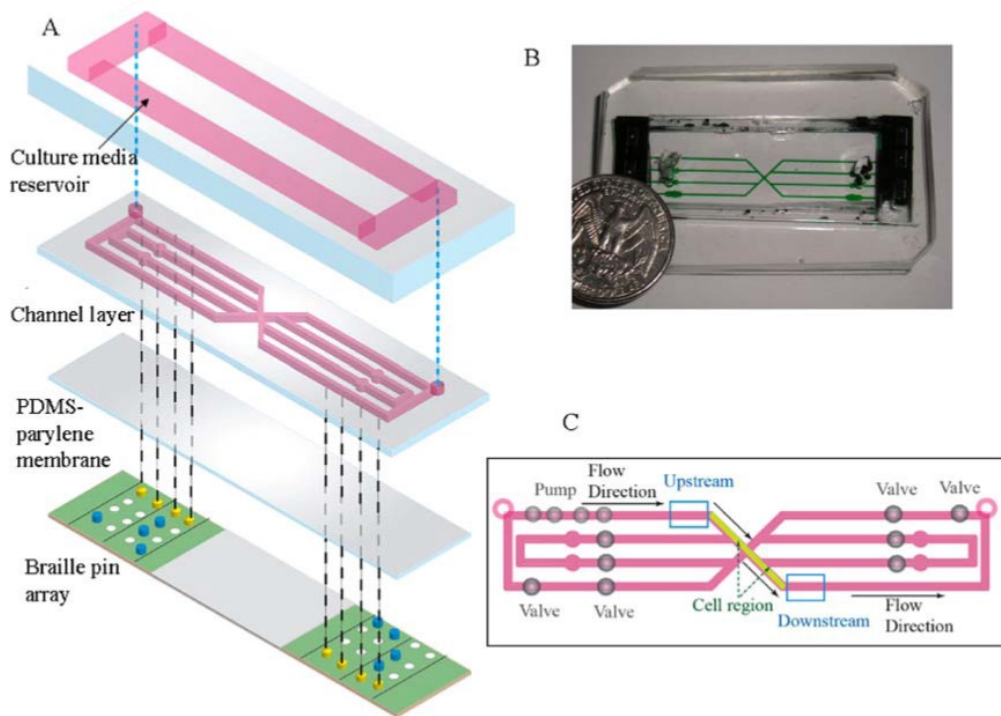


図 3.15 RTDP により酸素濃度を測定するデバイス [Mehta 2007]. A : デバイスの層構造, B : デバイス外観, C : 細胞培養流路とポンプの位置.

表 3.2 各センサの長所と短所一覧.

センサの種類	長所	短所
ファイバペア	市販のものを使用するため 定量性◎	デバイス構造に制限有り ファイバー先端部分にあたる 1点でしか測定できない
液体	流路内を直接測定 デバイス加工の必要無し 3次元測定への応用	細胞・代謝への影響を 防ぐことができない (定量性△)
シート	加工・接着が容易 デバイス構造に制限無し デバイス内の酸素濃度を 2次元的に測定可能	(定量性△)

## 3.5 デバイス内における酸素濃度勾配の計測方法の検討

### 3.5.1 酸素感応性蛍光材料の種類

本研究には、比較的安価で入手でき、PDMSなどのポリマーと混合し層を形成することが可能であるか、マイクロ流体デバイスに組み込む手法が存在する酸素感応性蛍光材料が必要である。酸素感応性蛍光材料の中で、安価に手に入れることができるものにピレン、RTDP、エリスロシン B、白金オクタエチルポルフィリンがあり、この中から本研究で使用するのに適した蛍光材料を選定し、実際に低酸素条件で蛍光するか確認する。ピレンは4種の蛍光材料の中で最も安価であるが、ポリマーと混合することが難しく、肝細胞に対し有毒であることが明らかになっているため [Choi 2004]、肝細胞を培養するデバイスに用いるのは不適であると考えられる。RTDPはポリマーと混合することは難しいが、RTDPを溶かしたPBSを培養液と混合することでマイクロ流路内の酸素濃度を計測することが可能である。培養液に混ぜて用いるため、細胞と蛍光材料の接触が不可避であるので、使用する細胞に対して無害か否かを考慮する必要がある。しかし、先行研究ではマウス横紋筋細胞株のC2C12細胞を培養しており、肝細胞にRTDPが無毒か否かは報告がない。また、マイクロ流体デバイス内での細胞培養は灌流培養の形をとるため、培養液に試薬を一定の割合で混合するにはデバイスに流入する直前に層流を作り試薬と培養液の混合する割合を正確に制御できる機構を作成しなくてはならない。対して、エリスロシン B は PDMS に混合可能、PtOEP は PS に混合可能であり、それぞれが層を形成することができる。酸素感応性蛍光材料を含んだ層（蛍光層）を形成できる場合、各蛍光材料を細胞培養流路の下に設置するだけで培養液に手を加えずに内部の酸素濃度を可視化できるため、エリスロシン B と PtOEP の方が RTDP よりも本研究に組み込みやすいと考えられる。しかし、エリスロシン B に関しては、混合可能なポリマーである PDMS のガス透過性が高いため、空気と接触している部分から酸素が PDMS 内に浸透し、エリスロシン B の反応が弱まってしまうことが予想される。ゆえに、ガス透過性の低い PS を用いて酸素センサを作ることのできる PtOEP を酸素感応性蛍光材料として選定する。なお、細胞培養流路の下に蛍光層を配置する場合、センサに用いる PS が液体を浸透させないことや、細胞の接着を高めるために蛍光層にコラーゲンによるコーティングを施すことが必須のため、蛍光層と細胞の間にコラーゲンの層が挟まることから、細胞と蛍光材料が接触する可能性や、酸素感応性蛍光材料が細胞培養流路内に溶け出す可能性は極めて低いと考えられる。

PtOEP に関しては、励起波長が 535 nm、蛍光波長が 646 nm であり、少量のトルエンと共に PS に溶解する [Montagne 2009]。PDMS に溶解しないため、酸素プラズマ処理のみでは接着が不可能であり、シランカップリングを行う必要があるが、接着不良を起こす確率

が高い。また、PSの薄膜は非常に破れやすく、扱いが難しい。一方で、エリスロシンBに比べて溶解した時に均一に混ざりやすく、混合可能なPSはガス透過性が低いため、PSにPtOEPを混合した蛍光層に直接細胞を蒔くことが可能であれば、培養液中の酸素濃度を直接測定することが可能で、極めてフィードバックの速いセンサとなることが期待できる。

#### 3.5.2 蛍光層のポリマーのガス透過性が酸素感応性蛍光材料の反応に与える影響の検証

##### 実験手順・実験環境

まず、PtOEP (31248-39-2, Frontier Scientific) を混合した PS (9003-53-6 average MW of 280 000, Sigma-Aldrich) をそれぞれスライドガラス (S9111 標準大型白縁磨 No. 1, 松浪硝子工業株式会社) にスピンコートし、蛍光層を作成した。そして、蛍光層の上に酸素濃度を0%に調整した溶液の液滴を滴下し、液滴を滴下した部分と外気に触れている部分で反応に差が出るかを確認した。酸素濃度が0%の溶液は水50 mLに対して亜硫酸ナトリウムを2.5 g溶かして作成した。

##### 結果・考察

PtOEPを混合したPS層の蛍光結果を図3.16に示す。酸素濃度0%の液滴を滴下した部分に関して、PtOEPを含むPS層は数秒ではっきりと蛍光した。酸素濃度を0%に調整した溶液の液滴を滴下した部分が蛍光すれば、酸素センサとして蛍光層が問題なく機能していると言える。従って、本デバイス内部の酸素濃度の可視化のための酸素感応性蛍光材料にPtOEPが適していることが示されたため、PtOEPをPSに混合し蛍光層を作成する。

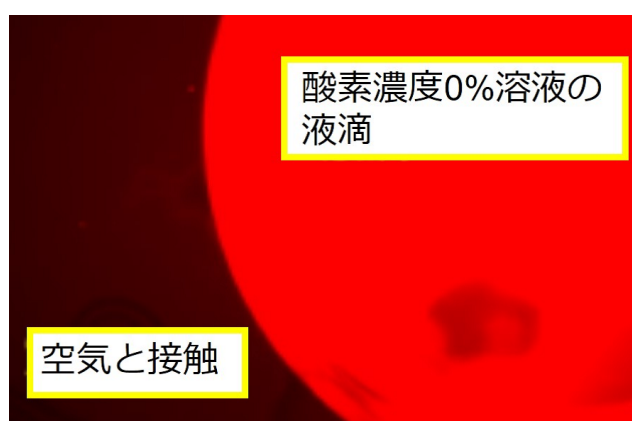


図 3.16 0% 酸素濃度溶液を滴下した場合の PtOEP を混合した PS 層の蛍光反応。



## 3.6 酸素濃度一定条件におけるデバイス内酸素センサの蛍光強度とその分布の評価

デバイス内で酸素濃度勾配を形成し、それを可視化して制御するには、デバイス内部の酸素濃度と酸素感応性蛍光材料の輝度を対応させる必要がある。そのため、本節では、酸素濃度既知の溶液を、酸素センサシートを底面に配置したデバイス内部に流した際の流路部分の輝度を測定し、その関係を導く。デバイス作製方法の詳細は第4章で述べる。

### 3.6.1 実験目的

まず、酸素濃度が様々である溶液を作成する。そして、作製した溶液をデバイス内部に流した際の流路部分の輝度を測定し、デバイス内部の酸素濃度と輝度の関係を評価し、内部で肝細胞を培養した場合に輝度から酸素濃度を導く事の出来る指標を設定する。

### 3.6.2 提案手法

まず、酸素濃度がさまざまである溶液の作成に3章3.3節(図3.4)に示した方法を用いる。酸素濃度が0%の溶液は水50 mLに対して亜硫酸ナトリウムを2.5 g溶かして作成する。それ以外の濃度の溶液は、ガス交換性の高いシリコンチューブを脱酸素剤エージレスを詰めた瓶の中に通し、そこに水を通すことで溶存酸素の低下させて作成する。シリコンチューブの長さを変化させたり、外径と内径の比の異なるチューブを用いることで、異なる酸素濃度の溶液の複数の作成が可能である。

### 3.6.3 実験環境・実験手順

実験のセットアップを図3.17に示す。デバイスの流入口に蛍光式酸素センサ(Flow-Through Cells with Oxygen Sensor, Pyro Science)を取り付け、流入する液体の酸素濃度を測りながらデバイス内の流路部の蛍光強度を測定した。

### 3.6.4 結果・考察

酸素濃度が0%の液体をデバイスに流した場合、最高輝度値で規格化すると、溶液が満たされている流路部分は0.75~1、流路以外の部分は0.25未満の蛍光を示した。また、酸素濃度と輝度の関係を図3.18に示す。縦軸に流路部分の輝度、横軸に酸素濃度を示す。なお、1~3 ppm、6~8 ppmに酸素濃度を調整した溶液を作製することが困難であり、4 ppm

前後に酸素濃度を調整することが出来たため、4 ppm 前後の酸素濃度に対応する輝度を測ることが出来た。肝臓内の酸素分圧は 50~15 mmHg であり [Jungermann 2000], 3.3.4 節の換算方法によって ppm に換算するとおよそ 2.2~0.6 ppm である。この範囲に酸素濃度を調整した溶液を作製することはできなかったが、酸素感応性蛍光材料の蛍光輝度は、後述の Stern-Volmer relationship に従うことが明らかになっているため [Brennan 2014], 範囲外の酸素濃度における蛍光輝度の結果を用いて近似を行うことで一定の信頼性のあるキャリブレーション結果を得るものとする。

グラフより、酸素濃度が低い液体をデバイス内に流した場合、流路部が蛍光することが確認された。酸素感応性蛍光材料においては、Stern-Volmer relationship が成立するため、酸素濃度 0 の場合の酸素感応性蛍光材料の蛍光強度を  $I_0$ 、酸素濃度  $[O_2]$  の場合の蛍光強度を  $I$ 、Stern-Volmer 係数を  $K_{SV}$  とすると、

$$I_0/I = 1 + K_{SV}[O_2]$$

の関係が成立するが、それぞれの係数の値は近似曲線より

$$I_0 = 27.0$$

$$K_{SV} = 0.506$$



図 3.17 蛍光輝度評価実験セットアップ。

であるとわかった。

感度及び分解能に関して、酸素濃度一定の溶液の灌流を開始してから約2~3分で蛍光輝度が一定値を示した。そのため、酸素濃度勾配の形成実験においては、酸素濃度勾配が形成され、内部の酸素濃度分布が安定した23分後に測定をすることで内部の酸素濃度分布を測定可能であることが示唆される。酸素センサシートに液滴を垂らした場合には数秒で蛍光輝度が安定したのに対して遅い結果となったが、これは、灌流により流れが生じているため、鉛直下向きの拡散速度が低下しているためだと考えられる。

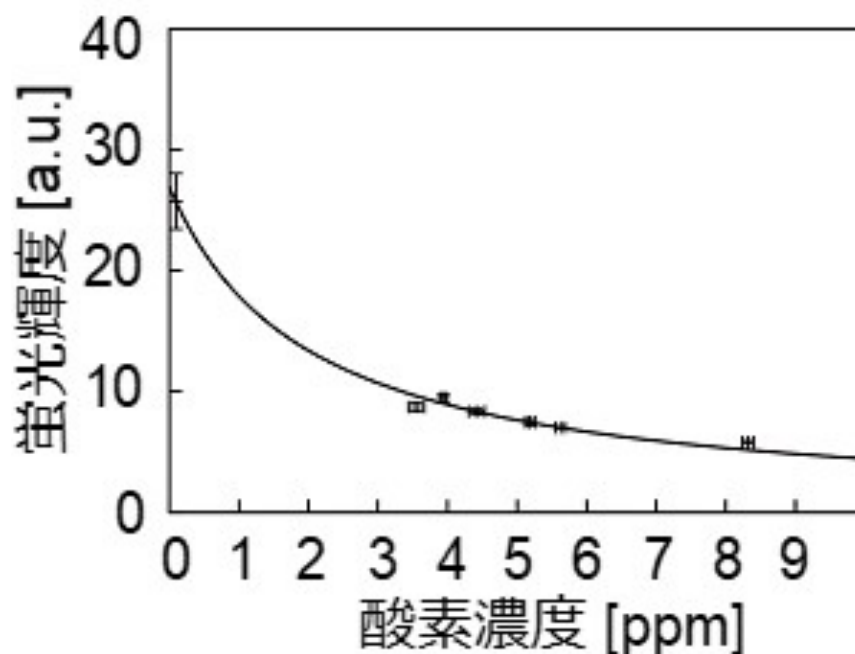


図 3.18 酸素濃度と輝度の関係.

## 3.7 結言

本章では、zonation を実現するための肝細胞培養システムを開発するにあたって、肝細胞培養デバイスの周りに必要な制御、計測システムについて述べ、各システムの機能評価及びキャリブレーションを行った。次章では、本デバイスシステムを用いて実験を行った後に、肝細胞の代謝機能を評価するための、生物学的観点での解析手法について説明する。

---

## 第 4 章

# Zonation 再現のための肝細胞培養デバイスシステムの開発および機能評価

---

4.1	緒言 .....	73
4.2	肝細胞培養システムの製作 .....	74
4.2.1	肝細胞培養デバイス .....	74
4.2.2	PDMS 製流路の成形 .....	77
4.3	HepG2 を用いた培養実験による免疫染色用デバイスシステムの機能評価..	85
4.3.1	実験目的 .....	85
4.3.2	酸素センサに含まれる PtOEP の毒性試験 .....	85
4.3.3	HepG2 の灌流培養 .....	85
4.3.4	デバイス内細胞染色方法と細胞数の計算方法 .....	86
4.3.5	使用した顕微鏡および画像処理方法.....	86
4.3.6	使用したセンサの空間分解能及びシグナル分解度 .....	86
4.3.7	層流と酸素拡散に関するマルチフィジックス解析 .....	87
4.3.8	結果・考察 .....	88
4.4	蛍光色素を用いた RT-qPCR 用デバイスシステムの機能評価 .....	94
4.4.1	実験目的 .....	94
4.4.2	シースフローとリエージェントフローの可視化.....	94
4.4.3	Trypsin 用 Inlet の直径とリエージェントフローの関係の検証 .....	94
4.4.4	流れと拡散に関するマルチフィジックス解析 .....	95
4.4.5	結果・考察 .....	95

4.5	HepG2 を用いた培養実験による PCR 用デバイスシステムの機能評価 .....	99
4.5.1	HepG2 の局所的蛍光染色 .....	99
4.5.2	細胞の局所的回収および、回収した細胞の RT-qPCR.....	99
4.5.3	結果・考察.....	100
4.6	結言 .....	105

---

## 4.1 緒言

本章では、前章までに述べた設計要件をふまえて、Liver zonation を再現するための肝細胞培養システムの設計・各機構の開発を行う。そして、開発したデバイス内部で肝細胞を培養した場合に酸素濃度勾配を形成できることを実証し、デバイス内部の酸素濃度分布を評価することを目的とする。ヒト肝がん細胞株である HepG2 細胞 (HepG2) をデバイス内部で灌流培養し、得られた蛍光センサフィルムの蛍光強度から、形成された酸素濃度分布の 2 次元的可視化・解析を行う。また、灌流する培養液の流量を制御することにより酸素濃度勾配の制御可能範囲を解析し、以上をもって本デバイスシステムの機能評価とする。

## 4.2 肝細胞培養システムの製作

### 4.2.1 肝細胞培養デバイス

#### デバイス作製手順の概要

マイクロ流体デバイスについて、PDMS (Silpot184, 東レ・ダウコーニング株式会社), PS (9003-53-6 Polystyrene average MW of 280 000, Sigma-Aldrich), カバーガラス (NEO カバーガラス 24 mm × 36 mm, 松浪硝子工業株式会社), スライドガラス (S9111 標準大型白縁磨 No. 1, 松浪硝子工業株式会社), PtOEP (31248-39-2 Platinum octaethylporphyrin, Frontier Scientific), 内径が 1 mm で外径が 2 mm のシリコンチューブ (SR チューブ 1 × 2, 信越ポリマー株式会社) を用いて作製した。今回作成するデバイスは流路高さを 100 μm 前後とするため、流路をソフトリソグラフィ法により作製した。

マイクロ流体デバイスの作製は、大きく分けて

- マスク基板へのフォトマスクのパターン転写
- 鋳型の作製
- PDMS 製流路の成形
- 蛍光層の成形
- 各層の接着

の 5 つの工程からなる。以下に各工程について述べる。

#### フォトマスクの複製

グラフィックデザインソフト (Adobe Illustrator, Adobe Systems) を用いてフォトマスクを設計した。それをもとに作製された、流路パターンの部分のみクロムの除去されたガラスマスク (2.5 インチ四方, 厚さ 1.6 mm) をミタニマイクロニクス株式会社に外注した。このガラスマスク原本の流路パターンを新たなマスク基板に転写して複製したフォトマスクのコピーの表面上に直接鋳型を構築する。そのためのフォトマスクの複製方法を述べる。

使用する 2.5 インチ × 2.5 インチのマスク基板 (CBL2506Bu-AZP, クリーンサアフェイス技術株式会社) は、ガラス, その表面に蒸着されたクロム薄膜, 更にその上に塗布されたポジ型フォトレジスト (AZP1350, 膜厚 5400Å) の 3 層からなる。マスク基板のフォトレジスト側とパターンニングされているガラスマスクのクロム側を重ね合わせてクリップで固定し, マスクアライナー (両面マスクアライナー PEM-800, ユニオン光学株式会社) で約 4 秒紫外線を当て, マスク基板に流路パターンを転写した。流路パターンが転写されたマスク基板を現像液 (AZ-Developer, AZ エレクトロニックマテリアルズ株式会社) に浸し, 紫外線



が照射された領域のポジ型レジストを溶解、除去した。その後、マスク基板をクロムエッチング液（混酸クロムエッチング液，関東化学株式会社）に浸漬し，ポジ型フォトレジストが除去された領域の露出しているクロム薄層を溶解・除去した。

### 鋳型の作製

鋳型の作製には，フォトレジストの構造を，転写して作成したフォトマスクの表面上に直接構築する方法をとった。鋳型の作製手順を以下に示す（図 4.1）。

#### 1. マスクの洗浄

過酸化水素水と硫酸を体積比 1:2 で混合した溶液にマスク基板を 5 分浸した。その後，イオン交換水で十分にすすいだ。

#### 2. フォトレジストのマスク表面へのスピコート

洗浄したマスク基板のクロム表面にフォトレジスト（KMPR1035, Microchem Inc.）をスピコータ（MS-A100, ミカサ株式会社）でスピコートした。スピコート条件は図 4.2 に示す。スピコート後のマスク基板表面のフォトレジストの質量は約 0.721 g であった。スピコート後にマスク基板上に残るフォトレジストの質量は，室温や湿度，フォトレジストの保存状態などに大きく依存する。対して，スピコート後のフォトレジストの質量と，最終的に現像されるフォトレジストのパターンの厚みとの関係には再現性がある。よって，鋳型の作製の度にフォトレジストの質量が約 0.721 g となるようスピコートの条件を調整する必要がある。

#### 3. 露光前のバイク（Soft bake）

フォトレジストをスピコートした基板を，水平に設置したホットプレート上で 55 °C で 30 分間熱した後 105 °C で 75 分間熱し，フォトレジストに含まれる溶媒成分を揮発させた。

#### 4. 露光

Soft bake を終えたマスク基板のガラス面に，マスクアライナーを用いて紫外線を約 1800 mJ/cm<sup>2</sup> 照射した。

#### 5. 露光後のバイク（Post bake）

露光を終えたマスク基板を，水平に設置したホットプレート上で 100 °C で 4 分間熱し，紫外線の照射されたフォトレジストの重合反応を終了させた。

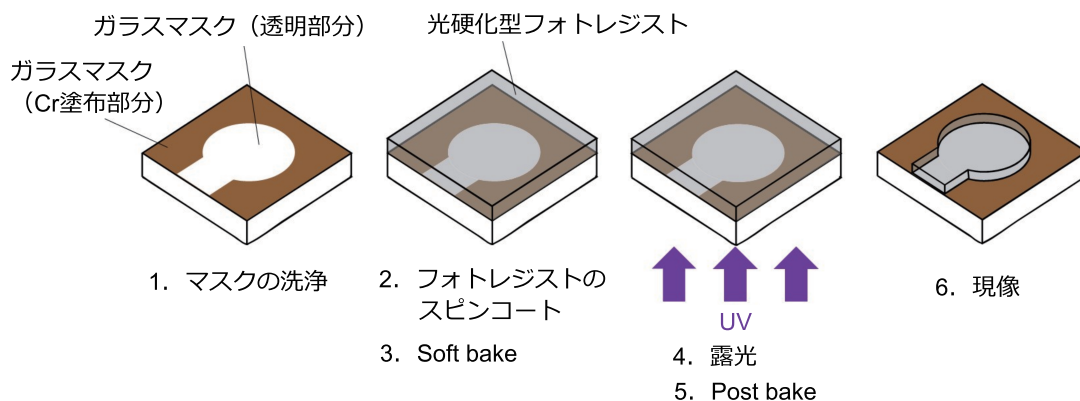


図 4.1 鋳型の作製手順.

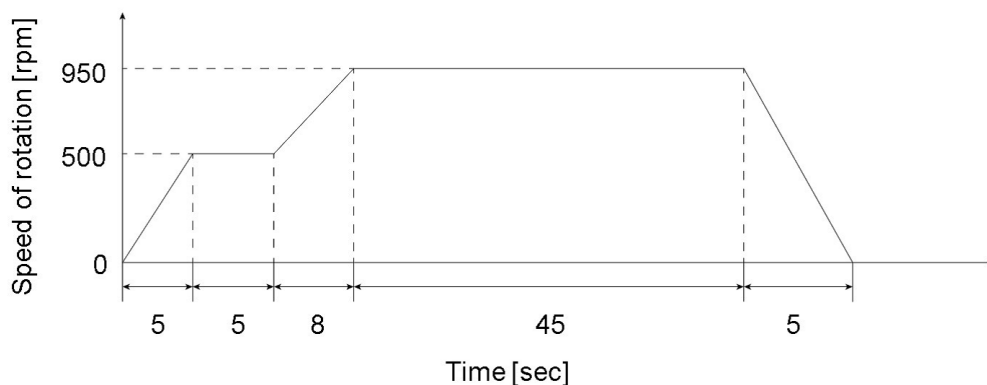


図 4.2 高さ約 100 mm の流路の鋳型を作成する際のフォトレジストのスピコート条件.

## 6. 現像

Post bake を終えたマスク基板を、現像液 (SU-8 Developer, Microchem Inc.) に 7.5 分間浸し、現像液を新しいものと交換した後さらに 7.5 分間浸し、紫外線に露光されていないフォトレジストを溶解、除去した。さらに、マスク基板をイソプロパノールとイオン交換水で洗浄し、風乾した。

以上の過程で作成した鋳型の寸法は図 4.4 となる。細胞培養用流路鋳型のフォトレジストについて、流路の 4 か所の高さの平均が約 306  $\mu\text{m}$  のものと、約 92  $\mu\text{m}$  のものの 2 種類を作成し、前者を免疫染色用、後者を RT-qPCR 用のデバイスに用いた。細胞回収用流路鋳型のフォトレジストについては、流路の 4 か所の高さの平均が約 108  $\mu\text{m}$  のものを作成した。流路高さ約 92  $\mu\text{m}$  の細胞培養用流路鋳型と流路高さ約 108  $\mu\text{m}$  の細胞回収用流路鋳型のスピコート条件を図 4.2 に、流路高さ約 306  $\mu\text{m}$  の細胞培養用流路鋳型のスピコート条件を図

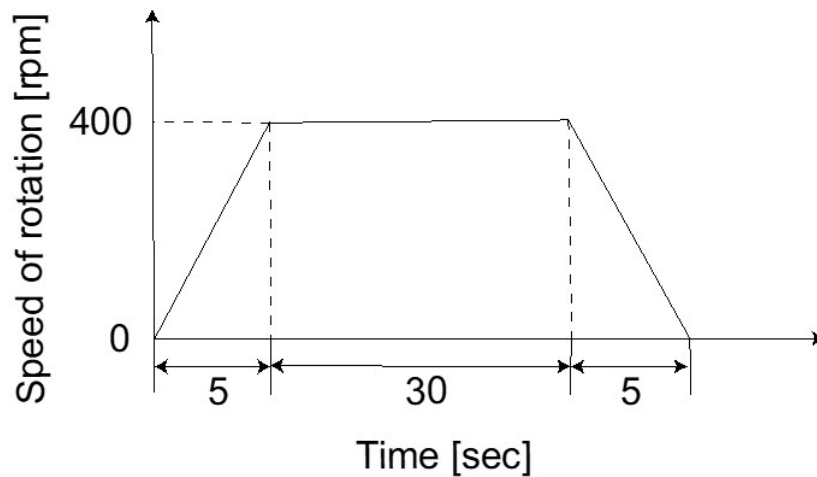


図 4.3 高さ約 300 mm の流路の鋳型を作成する際のフォトレジストのスピンコート条件。

4.3 に示す。なお、細胞培養用流路およびそのフォトレジスト状の流路の形状に関して、将来的には、図 4.5 のように、酸素センサフィルムと細胞培養用流路の PDMS 層の間に網目状の流路を彫った PDMS を挟み込み、流路の三次元構造化を行う事を想定し、そのため、アライメント用の印を設けている。網目状流路の PDMS 層に関して、蛍光層により酸素濃度を可視化するためには流路 PDMS を 50  $\mu\text{m}$  程度の薄さにする必要があることと、鋳型を用いて PDMS を流し込む本方法では、厚みを 50  $\mu\text{m}$  程度の薄さに調整することが難しいことから、本研究ではデバイス構造に組み込んでいない。また、細胞培養流路の形状に関しては、網目状流路の形状に合わせて設計しており、流入口から流出口にかけて培養液を流したときに渦が発生しないように、図 4.4 のような丸みを帯びた構造になっている。

## 4.2.2 PDMS 製流路の成形

細胞培養用流路及び細胞回収用流路の成形手順について述べる（図 4.6）。

### 1. 注型

直径 10 cm の円形培養皿（663161, Greiner Bio-One）に鋳型を入れ、PDMS の溶剤と硬化剤を重量比 10:1 で混合したものを、厚さが約 0.7 mm になるよう、10 g 流し込んだ。この量は、本注型方法で 30 分以内に培養皿底面に均等に広がり、かつ 1 mm 未満の薄さの PDMS 層を作製できる量である。PDMS を培養皿に流し込んだ後、培養皿をデシケータに入れ 30 分間脱気し、PDMS 中の気泡を取り除いた。

### 2. ベイク

PDMS を流し込んだ培養皿を、水平に設置したホットプレート上で 75  $^{\circ}\text{C}$  で 60 分熱し、

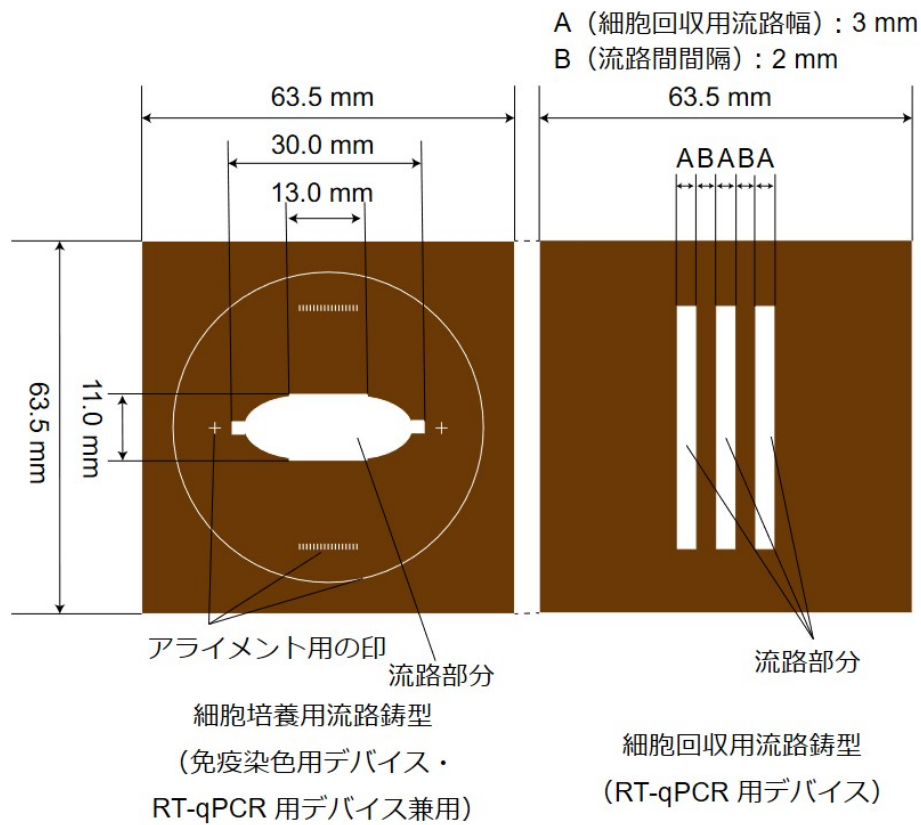


図 4.4 作製した鋳型の寸法.

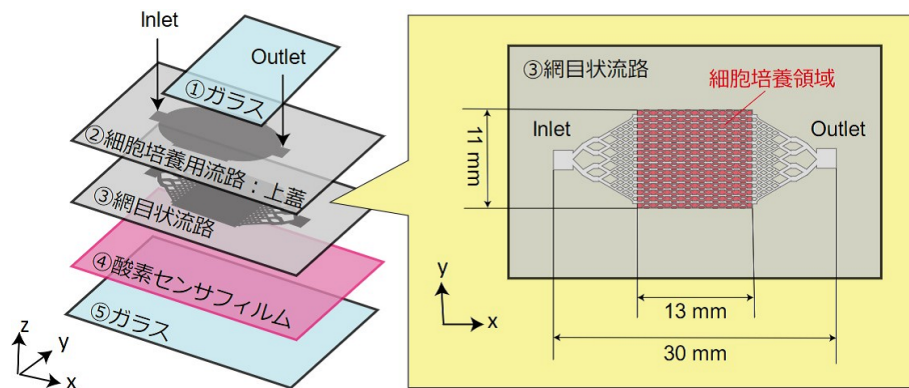


図 4.5 三次元構造化を施した場合のデバイス予定図.

重合, 硬化させた. その後, 硬化した PDMS を鋳型から剥がし, 曲がりやすくするために, さらに 150 °C で 60 分熱した.

3. 穴あけ・切削免疫染色用のデバイスを作成する場合は, 細胞培養用流路の Inlet と Outlet

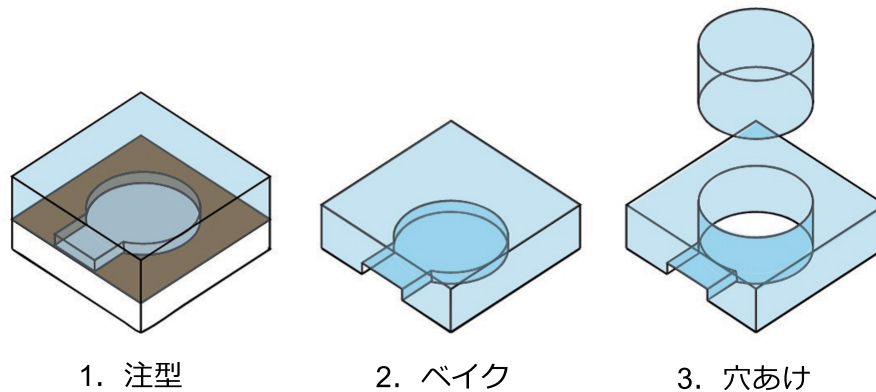


図 4.6 PDMS の成形手順.

の計 2 か所にバイオプシーパンチ（生検トレパン，生研貝印株式会社）を用いて穴をあけた． RT-qPCR 用のデバイスを作成する場合は，下の層となる細胞培養用流路の PDMS を切削し，流路部分のみを取り除く．その上に接合する細胞回収用流路の PDMS については，3 本の流路それぞれにおける PBS 用 Inlet，Trypsin 用 Inlet および Outlet と，細胞回収用流路の Inlet と Outlet の計 11 か所に，バイオプシーパンチを用いて穴をあけた．

#### 蛍光層の成形

蛍光層のポリマーには PS を用いて，スピコートにより成形する．トルエン約 20 mL に PtOEP  $6.0 \times 10^{-4}$  g を混合した後，PS 5 g を混合し PS をゲル状にし，スピコート可能な状態にした．この PtOEP の量は，トルエンが全て蒸発した際に PS 中の PtOEP の濃度が  $1.8 \times 10^{-4}$  M となる量である．スライドガラスをダイヤモンドカッターを用いて 38 mm × 56 mm に切断し，切断面をやすりで面取りし，埃を十分に飛ばした後，その表面上に PtOEP を混合した PS をスピコータでスピコートした．スピコート条件は図 4.7 に示す．スピコート後のマスク基板表面の PDMS の質量は約 0.221 g であり，蛍光層の 4 か所の厚みの平均をとると約 84  $\mu\text{m}$  であった．その後，水平に設置したホットプレート上で室温で一晩放置し，重合，硬化させ，PS からトルエンを完全に蒸発させた．PtOEP を用いた PS 製蛍光層の厚みに関しては，100  $\mu\text{m}$  程度の厚みであれば，対応する酸素濃度と蛍光強度の関係に厚みが影響しないことが報告されている [Montagne 2009]．

### 各層の接着

接着方法と順番は図 4.8 に示す。各層の接着について、PDMS とガラスの接着には酸素プラズマ処理によるパーマネントボンディングを行った。PS はケイ素を含まないため、酸素プラズマ処理のみでは他の層と接着することが出来ない。そのため、PS とガラス、PS と PDMS の接着にはシランカップリングを行った。蛍光部 PS とスライドガラスについては、スピコートでは接着しないため、スピコートした後に蛍光部 PS が固まったら、スライドガラスから剥離し、シランカップリングにより再度接着させる必要がある。

#### \*シランカップリングの手順

##### 1. シラン溶液の作成

3-アミノプロピルトリメトキシシラン (KBM-903, 信越シリコーン) と水を 1:100 で混合させた溶液を、10 mL 作成した。

##### 2. シランカップリングで接着させる PS 膜の酸素プラズマ処理

PS 層のシランカップリングで接着させる面をドライエッチング装置を用いて、75 W で 6 秒、酸素プラズマ処理をした。今回は PS の両面をシランカップリングで接着させるので、両面とも酸素プラズマ処理を施した。

##### 3. シラン溶液への浸漬

酸素プラズマ処理を施した PS 膜を、作成したシラン溶液に 37 °C で 20 分間浸漬した。その後、PS 膜を滅菌水で 2 回すすぎ、2 回目に注いだ滅菌水に浸して、接着までの間保存した。

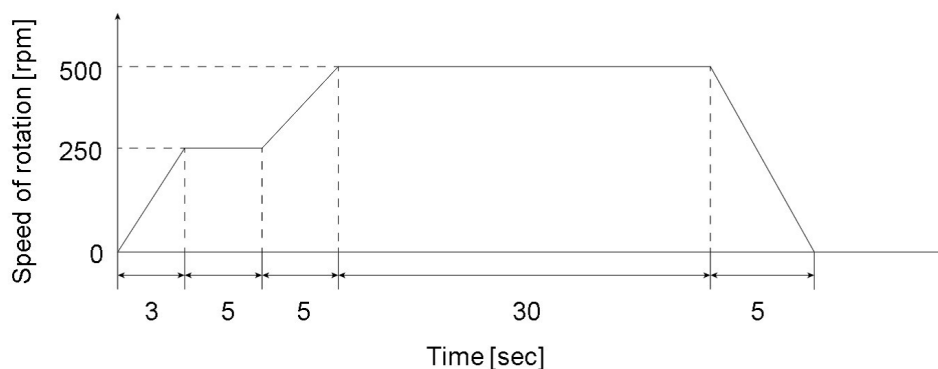


図 4.7 PS 層のスピコート条件。

#### 4. ケイ素を含む層の酸素プラズマ処理

PS と接着させるガラス, PDMS にドライエッチング装置を用いて, 75 W で 6 秒, 酸素プラズマ処理をした。

#### 5. 接着

滅菌水に浸しておいた PS 膜とガラス, PDMS を接着し, 室温で一晩放置して乾燥させた。

なお, シランカップリングされた表面では細胞を培養した場合に, 細胞に対して無毒である。

全体の接着手順は以下である。まず, カバーガラス, 上蓋 PDMS の片面にドライエッチング装置 (RIE-10NR, サムコ株式会社) を用いて, 75 W で 6 秒, 酸素プラズマ処理をし, パーマネントボンディングした。そして, カバーガラスと上蓋 PDMS を接着した。次に, 接合したカバーガラスと上蓋 PDMS, 培養部 PS, スライドガラスを上記シランカップリングの手法で接着した。最後に, バイオプシーパンチを用いてドーナツ型に切り出した PDMS にシリコンチューブを刺し, 抜けないように接着部分に液体状 PDMS を塗りベイクして全体を固めたものを 2 個作製した。それを図 4.9 に示す。このチューブの PDMS 面と, デバイス上面に酸素プラズマ処理を 75 W で 6 秒施して, デバイスの流入口, 流出口部分に接合した。

以上の工程から作製したデバイス外観を図 4.10 に示す。また, 製作した免疫染色用デバイスの層の厚みと流路の寸法を図 4.11 に, RT-qPCR 用デバイスの層の厚みと流路の寸法を図 4.12 に示す。免疫染色用デバイスに関して, HepG2 用デバイスは流路高さ 100  $\mu\text{m}$ , Rat

#### 1. パーマネントボンディング

①と②の接合面に  
O<sub>2</sub>プラズマ照射 6s  
→接合

#### 2. パーマネントボンディング

+シランカップリング  
③の両面にO<sub>2</sub>プラズマ照射 6s  
→③をシラン含む溶液に浸す (20分)  
→②, ④の接合面にO<sub>2</sub>プラズマ照射 6s  
→②③④を接合, 乾燥を待つ

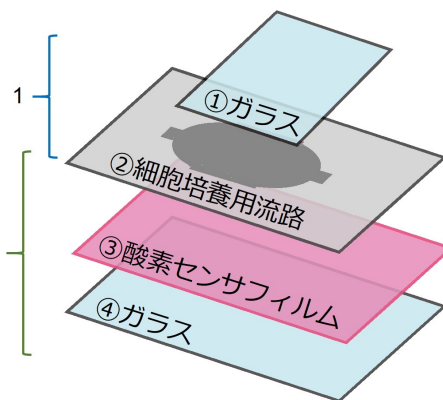


図 4.8 デバイスの各層の接合順と接合方法。

初代培養肝細胞用デバイスは流路高さ 300  $\mu\text{m}$  で作製した。これは、流路高さ 100  $\mu\text{m}$  の HepG2 用デバイスを用いて Rat 初代培養肝細胞の培養を試みたところ培養に失敗したが、流路高さを 300  $\mu\text{m}$  まで高くした場合に培養に成功したためである。高さ 100  $\mu\text{m}$  のデバイスで培養に失敗した理由は、過剰なシアーストレスによるものだと考えられる。本デバイスにおいて、高さ 100  $\mu\text{m}$ 、300  $\mu\text{L}/\text{min}$  の細胞培養用流路に 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で培養液を灌流させた場合、シアーストレスはそれぞれ  $1.2 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ 、 $4.0 \times 10^{-3} \text{ Pa}$  と計算される。細胞は 0.2 ~ 0.6 Pa 以上のシアーストレスで細胞機能の低下が起これると考えられており、この値に比べてデバイス内に発生するシアーストレスは低く見積もられているが、肝細胞は *in vivo* において流れに晒されていないため、シアーストレスに弱い可能性があり、そのためこのような培養結果になったと考えられる。RT-qPCR 用デバイスに関しては、本研究では灌流培養を行っているのが HepG2 を用いた実験のみのため、流路高さは細胞培養用流路、細胞回収用流路ともに 100  $\mu\text{m}$  のものを製作した。静置培養系においては、各流路高さが 100  $\mu\text{m}$  である RT-qPCR 用デバイスを用いても、Rat 初代培養肝細胞を培養することが可能であった。

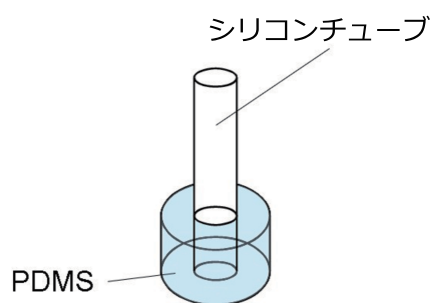


図 4.9 流入口，流出口に接合するチューブの構造。



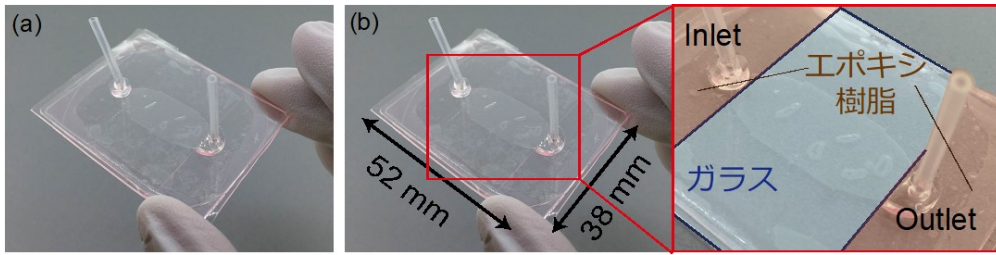
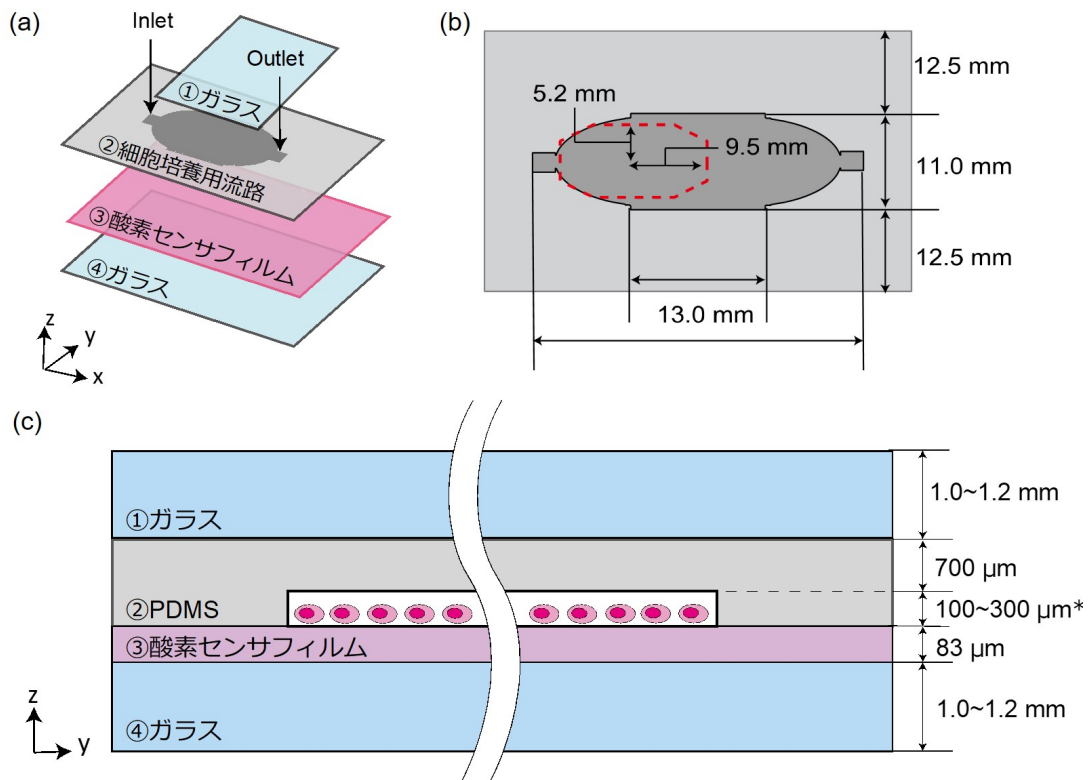


図 4.10 デバイス外観.



\* チャンネル高さについて、HepG2 用が 100  $\mu\text{m}$ 、Rat 初代培養肝細胞用が 300  $\mu\text{m}$

図 4.11 作製したデバイスと流路の構造および寸法. a: デバイスの層構造, b: 流路の形状, c: 流路断面図.

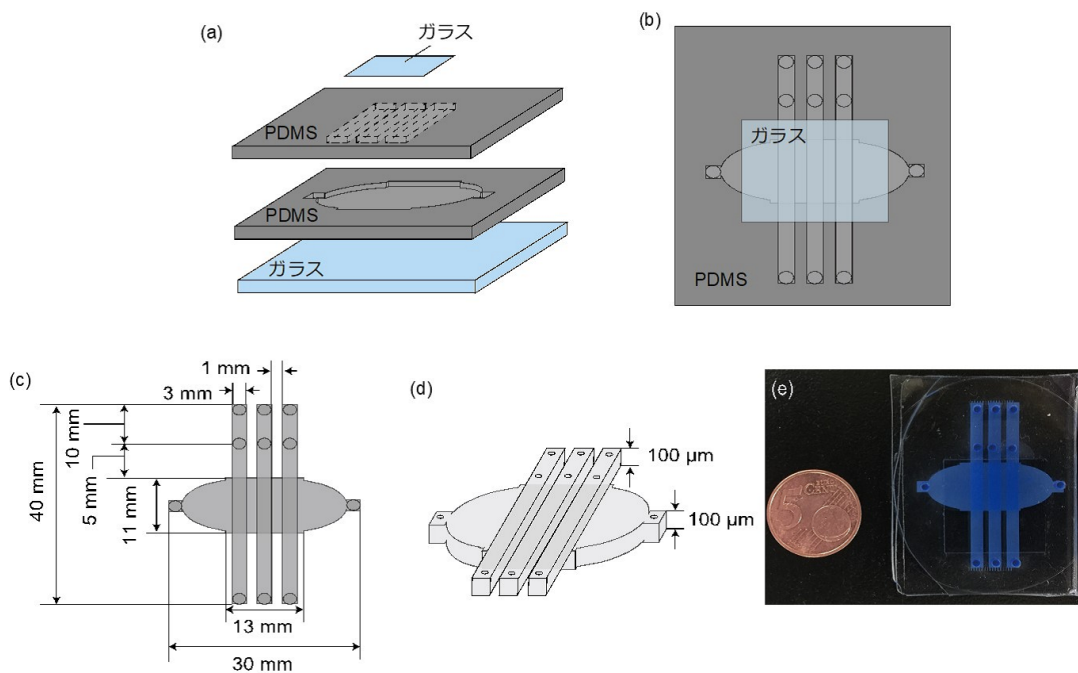


図 4.12 PCR 用デバイスの構造・寸法および外観. a: デバイスの層構造. b: デバイスの表面図. c: 細胞培養用流路および細胞回収用流路の寸法詳細. d: 細胞培養用流路および細胞回収用流路の高さ. e: デバイス外観.

## 4.3 HepG2 を用いた培養実験による免疫染色用デバイスシステムの機能評価

### 4.3.1 実験目的

本研究で作製した免疫染色用のデバイスを用いて肝がん細胞株の一種である HepG2 の灌流培養を試みた場合に、まず、HepG2 が正常に培養可能であるか、次に、培養可能であった場合にデバイス内部に酸素濃度勾配を形成可能であることを示す。そして、酸素センサの蛍光輝度を酸素濃度に変換し、デバイス内の酸素濃度分布を 2 次元的に可視化する。

### 4.3.2 酸素センサに含まれる PtOEP の毒性試験

予備実験として、デバイス底面に敷かれた酸素センサに含まれる PtOEP が細胞に与える影響を確認するため、PS 製細胞培養ディッシュ底面に酸素センサとして使用している PtOEP を含む PS をコーティングしたものと、そうでないものを用いて、それぞれ HepG2 を、CO<sub>2</sub> インキュベータ内 (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) で 72 時間培養した。そして、Trypsin (TrypLE Express Enzyme 12605028, Thermo Fischer Scientific Inc.) を用いて細胞を回収したのちに、Trypan blue (T10282, Thermo Fischer Scientific Inc.) を用いて、72 時間培養後の細胞数と細胞の生存率を比較した。直径 60 mm の細胞培養ディッシュを使用し、各ディッシュをコラーゲン溶液でコーティングしたのち、1 ディッシュにつき  $1.0 \times 10^6$  個の細胞を播種した。コラーゲン溶液は MilliQ 水 9 mL に 1N HCL を 10  $\mu$ L を加えたのち、コラーゲン 1-P (Cellmatrix Type 1-P, 新田ゼラチン) を 1 mL 加えて調製した。

### 4.3.3 HepG2 の灌流培養

まず、作製したマイクロ流体デバイスを脱気した後、流路内を 70% エタノールで満たして滅菌した。次に、デバイス流路内を前節で述べたものと同様のコラーゲン溶液でコーティングしたのち、培養液 (DMEM (DMEM GlutaMAX High Glucose Pyruvate, Life Technologies Corporation), 10 % ウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum Canada origin, Hyclone), 抗生物質 (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension (100X), 和光純薬工業), 非必須アミノ酸 (MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X), Life Technologies Corporation) を加えたもの) でデバイス内を洗浄し、HepG2 をデバイス内に播種した。播種細胞数は  $1.0 \times 10^6$  個とした。播種方法について、播種する数の細胞を含んだ 50  $\mu$ L の懸濁液を作成し、あらかじめ培養液を満たしておいたデバイス内に、デバイス流入口からゆっくりとマイクロピ

ペットを用いて懸濁液を流し込んだ。80  $\mu\text{L}$  は流路の容積に満たないため、懸濁液がデバイスからあふれることなく細胞をデバイス内に送り込むことが可能である。可能な限り均一に細胞を播種するために、適宜流入口または流出口から培養液を流し込む、デバイスを振蕩させるなどをして細胞播種部分を調整した。その後、 $\text{CO}_2$  インキュベータ内 (37  $^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) で1日間前培養した後に、シリンジポンプ (MFS-SP1, マイクロ流体システム工房) を用いて灌流培養を開始した。培養液の流量は 1, 5, 10 および 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  で、それぞれ 30 分間灌流培養を行った。そして、得られた酸素濃度分布や酸素濃度勾配を比較した。

### 4.3.4 デバイス内細胞染色方法と細胞数の計算方法

灌流培養終了後、デバイス内の細胞分布を可視化するために、PKH67 Green fluorescent cell linker (Sigma Aldrich) により細胞膜の染色を行った。そして、酸素濃度分布を撮影した後、デバイス内を PBS を用いて洗浄し、Trypsin (TrypLE Express Enzyme 12605028, Thermo Fischer Scientific Inc.) により細胞をデバイス内から回収し、Trypan blue (T10282, Thermo Fischer Scientific Inc.) を用いて染色することで細胞数を数えた。

### 4.3.5 使用した顕微鏡および画像処理方法

いずれの条件においても、細胞播種直後、流量切り替え時および最終日に倒立顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) で観察し、蛍光顕微鏡像を撮影して画像の輝度値から蛍光強度を解析した。蛍光顕微鏡像の撮影には、4倍対物レンズ (CFI Plan Apo  $\lambda$  4x, KEYENCE), BZ-X フィルタ (Texas Red, KEYENCE) を用いた。撮影フレームの露光時間は 0.2 秒とした。また、培養細胞の拡大明視野画像に関しては、倒立顕微鏡 (Olympus IX71, Olympus) と 10倍対物レンズ (UPLFLN 10X2, Olympus) を用いて撮影した。画像の撮影方法と画像処理に関して、上記の蛍光顕微鏡では 1 枚の写真でデバイス全体を映すことは不可能だったため、各デバイスについて隙間なく  $9 \times 9$  枚の画像を自動で撮影し、イメージジョイント機能を用いて位置合わせを行いながら連結し、デバイス全体の画像を撮影した。実験セットアップを図??に示す。撮影した酸素センサの蛍光画像に関しては、Gnuplot を用いて蛍光輝度を酸素濃度に変換した。その後、Image J を用いて Inlet からの距離に対する酸素濃度の変化を計測し、酸素濃度勾配を評価した [Schneider 2012]。

### 4.3.6 使用したセンサの空間分解能及びシグナル分解度

酸素センサを観察する際の空間分解能に関して、前項で述べた倒立顕微鏡を用いて観察を行った際に取得した蛍光画像は、3874 pixel  $\times$  2838 pixel において約 20.9 mm  $\times$  15.5 mm

の範囲を映した。これより、空間解像度は約  $5.4\sim 5.5\ \mu\text{m}/\text{pixel}$  と計算できる。また、撮影した画像の蛍光輝度が 256 段階であるため、シグナル分解度は 256 段階となる。

#### 4.3.7 層流と酸素拡散に関するマルチフィジックス解析

得られた結果に対してシミュレーション結果と比較考察を行うため、設計製作したデバイス内での層流と酸素拡散に関してマルチフィジックス解析を行った。シミュレーションには汎用性ソフトウェア COMSOL Multiphysics (COMSOL Inc.) を用いた。流れ、酸素拡散に関して、それぞれ「層流」「希釈種輸送」のコマンドにおける以下の方程式を計算した。

$$\frac{\partial u_i}{\partial x_i} = 0 \quad (4.1)$$

$$\frac{\partial u_i}{\partial x_j} \rho u_j = -\frac{\partial P_i}{\partial x_i} + \mu \frac{\partial^2 u_i}{\partial x_i \partial x_j} \quad (4.2)$$

$$\frac{\partial}{\partial x_i} \left( \rho u_i \phi_k - \rho D_k \frac{\partial \phi_k}{\partial x_i} \right) = S_k \quad (4.3)$$

式 (1), (2), (3) は、それぞれ質量平衡、運動量平衡、移流拡散方程式を示す。上記の式において、 $u$  は流速、 $P$  は圧力、 $\rho$  は密度、 $\mu$  は粘度、 $D$  は拡散係数を表す。移流拡散方程式 (式 (3)) の束縛条件は壁面の流束により決定される。式 (4) (5) は代謝産物の流束を表す。流路底面での酸素消費は式 (4)、流路天井面での酸素消費は式 (5) で表される。酸素の運搬に関して、本デバイスでは壁面からの酸素の流入を防いでいるため、酸素の拡散流動  $F_{ext,k}$  を 0 とする。細胞の酸素消費量は文献値および実験結果に沿うものを代入した。

$$\left( -\rho D_k \frac{\partial \phi_k}{\partial x_i} \right)_{cell, wall} = \rho (N_{cell} V_{max,k} - F_{ext,k}) \quad (4.4)$$

$$\left( -\rho D_k \frac{\partial \phi_k}{\partial x_i} \right)_{top, wall} = F_{ext,k=O_2} = 0 \quad (4.5)$$

式 (5) 中の  $\phi_k$  は物質  $k$  の濃度を表す。 $N_{cell}$  は細胞密度、 $V_{max,k}$  は物質  $k$  の消費量を表す。

また、デバイス流路中央部のせん断応力  $\tau$  は

$$\tau = \frac{6\mu Q}{wh^2} \quad (4.6)$$

と表される。 $Q$  は流速、 $w$  は流路幅、 $h$  は流路高さ、 $\mu$  は培養液の粘性を表す。培養液の粘性は水の粘性と同じ値を用いている。これらを用いて拡散時間、対流時間、レイノルズ数をそれぞれ式 (7), (8), (9) のように求めた。

$$\tau_d = \frac{L^2}{D} \quad (4.7)$$

$$\tau_c = \frac{L}{U} \quad (4.8)$$

$$Da = \frac{N_{cell} V_{max} H}{DC_i} \quad (4.9)$$

式 (7) における  $L$  は酸素の拡散距離,  $D$  は拡散係数を表す. 式 (8) における  $L$  は酸素の対流距離,  $U$  は特性速度を表す. 式 (9) における  $N_{cell}$  は細胞密度,  $V_{max}$  は対象とする細胞の酸素消費量,  $H$  は流路高さ,  $D$  は溶質の拡散係数,  $C_i$  は流路入り口での溶質の酸素濃度である.

#### 4.3.8 結果・考察

##### 酸素センサに含まれる PtOEP の毒性試験

実験結果を表 4.1 に示す. 72 時間培養後の細胞数は, 酸素センサコーティング無しのディッシュでは  $2.8 \times 10^6 \pm 5.0 \times 10^5$  個 ( $n=3$ ), 酸素センサコーティング有りのディッシュでは  $2.7 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^5$  個 ( $n=3$ ) であった. また, それぞれの細胞の生存率は, 酸素センサコーティング無しのディッシュでは  $84 \pm 3\%$  ( $n=3$ ), 酸素センサコーティング有りのディッシュでは  $74 \pm 8\%$  ( $n=3$ ) であった. 結果から, PtOEP を加えて作製した PS 製酸素センサの上に HepG2 を培養する場合, PtOEP による細胞増殖の阻害や毒性等の影響は極めて小さいと示唆された.

##### HepG2 の灌流培養

図 4.13 に灌流培養開始前, および実験終了後の細胞の明視野画像を示す. 1 日の静置培養を経て HepG2 はデバイス底面に正常に接着し, 灌流培養によるせん断応力によって剥離することなく接着状態を保てることが確認できた. また, 播種した細胞数と播種直前の細胞の生存率はそれぞれ  $1.0 \times 10^5$  個,  $93.8 \pm 1.2\%$  ( $n=3$ ), 実験終了後の細胞数および細胞の生存率は  $8.5 \times 10^5 \pm 1.0 \times 10^4$  個,  $75 \pm 1.0\%$  ( $n=3$ ) であった. 各流培養条件における流路中心部の培養液の流束とせん断応力を計算したものを表 4.2 に示す.

HepG2 の灌流培養実験の結果を図 4.14 に示す. PKH67 で細胞膜染色を行うことで細胞の位置情報を蛍光緑で表すと同時に, 内部の酸素濃度分布を酸素センサを用いて蛍光赤で表した後に第 3.6 節の結果を用いて画像処理を行い 2 次元的な可視化に成功した. 細胞膜染色結果に関して, 細胞の播種密度に若干不均一性がみえるが, これは, 灌流培養時の肝細胞へ

表 4.1 肝細胞培養条件.

条件	播種細胞数 (個)	培養液の流量 ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	
		72 時間培養後の 細胞数 (個)	72 時間培養後の 細胞生存率 (%)
酸素センサ (PtOEP + PS) コーティング無し	$1.0 \times 10^6$	$2.8 \times 10^6 \pm 5.0 \times 10^5$	$84 \pm 3$
酸素センサ (PtOEP + PS) コーティング有り	$1.0 \times 10^6$	$2.7 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^5$	$74 \pm 8$

のせん断応力を軽減するため流路幅を広くしているためだと考えられる (図 4.14a). また, デバイス内の酸素濃度の 2 次元的可視化に成功し, 各流量条件においてデバイス内の上流ほど酸素濃度が高く, 下流に向かうほど低くなる結果が得られたため, 本デバイスシステムを用いて HepG2 培養時にデバイス内部に酸素濃度勾配が形成可能であることが示された (図 4.14b, c). デバイスの上流から下流にかけて酸素濃度が低下した後, 下流で再度酸素濃度が増えている. この理由として, 特に 0, 1  $\mu\text{L}/\text{min}$  などの流量が少ない場合において顕著であり, 流量が多くなるにつれて下流での酸素濃度の増加が抑えられていることから, Outlet から酸素が拡散によりデバイス内に流入しているためであると考えられる. 各流量における灌流培養条件においてデバイス中心部の酸素濃度を流路幅方向に平均を取りつつ流路方向にプロットすることで, 酸素濃度勾配を計算した. 計算方法を図 4.15a に, 酸素濃度の平均を流路方向にプロットしたものを図 4.15b に示す. 酸素濃度の単位について, 酸素センサの蛍光輝度からはグラフの結果をもとに近似直線を引き, その直線の傾きとして酸素濃度勾配を求めたものと, シミュレーションを比較して載せたものを表 4.3 に示す. 蛍光輝度からは単位 ppm を用いて酸素濃度を算出し, 3.3.4 節にならって ppm から mmHg の単位の変換を行った. また, 表 4.3 に対応したシミュレーションにおける 2 次元酸素濃度分布および酸素濃度勾配のグラフをそれぞれ図 4.16, 図 4.17 に示す. まず, 実験により得られた酸素濃度勾配の値に関して, 流量が多いほど酸素濃度勾配が緩やかになることが明らかになった. これは, 流量を多くするほど単位時間にデバイス内に供給される酸素量が多くなるため, 単位時間あたりの培養液からの酸素供給量が細胞の単位時間あたりの酸素消費量を徐々に上回っていくからであると考えられる. また, 図 4.15b のグラフにおけるサンプル数は  $n=5$  であり, エラーバーは標準誤差を表す. 図 4.14a から, 細胞の播種密度に不均一性が見られるにもか

かわらず、本デバイスシステムを用いると、一定の細胞数を播種し、培養液の流量を変化させることで、一定の再現性をもってデバイス内部に形成される酸素濃度勾配を制御できることが示された。

シミュレーションとの比較結果からは、培養液の流量が 1, 20 $\mu\text{L}/\text{min}$  の場合は HepG2 の 1 細胞の酸素消費量を  $1.5 \times 10^{-17} \text{ mol}/\text{cell}$ , 5, 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  の場合  $6.0 \times 10^{-17} \text{ mol}/\text{cell}$  に設定した場合に実験結果と同様の酸素濃度勾配が形成されることが示された。すなわち、培養液の流量を 1, 20 $\mu\text{L}/\text{min}$  で培養した場合、5, 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で培養した場合よりも HepG2 の酸素消費量が少なくなっていると考えられる。肝細胞の酸素消費量は周囲の酸素濃度が低いほど低くなるという報告がある [Foy 1994]。灌流する培養液の流量を少なくするほど供給される酸素量が減少するため、デバイス内の酸素濃度は低下する。本実験結果において、1  $\mu\text{L}/\text{min}$  で灌流培養した場合に 5, 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  で培養した場合よりも酸素消費量が減っていたことがこの報告を裏付けていると示唆される。しかし、20  $\mu\text{L}/\text{min}$  においては、流量が多く酸素供給が増加していたにもかかわらず HepG2 の酸素消費量は減少していた。これに関しては、酸素供給は十分であったが流速が速く、培養液の流れによるせん断応力が強くなっているために細胞への負担がかかり、細胞の酸素消費量が下がった可能性が考えられる。

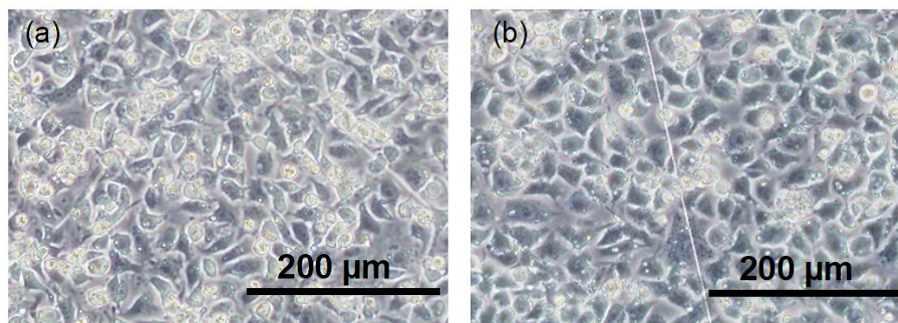


図 4.13 デバイス内の HepG2 の様子. a: 灌流培養開始前（播種 6 時間後）の細胞の様子. b: 2 時間の灌流培養後（実験終了時）の細胞の様子.

表 4.2 各流量で培養液を流した際の、デバイス中心部の培養液の流速と細胞にかかるせん断応力.

培養液の流量 [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	流速 [ $\mu\text{m}$ ]	せん断応力 [Pa]
1	9	$1.2 \times 10^{-3}$
5	45	$5.9 \times 10^{-3}$
10	90	$1.2 \times 10^{-2}$
20	180	$2.4 \times 10^{-2}$



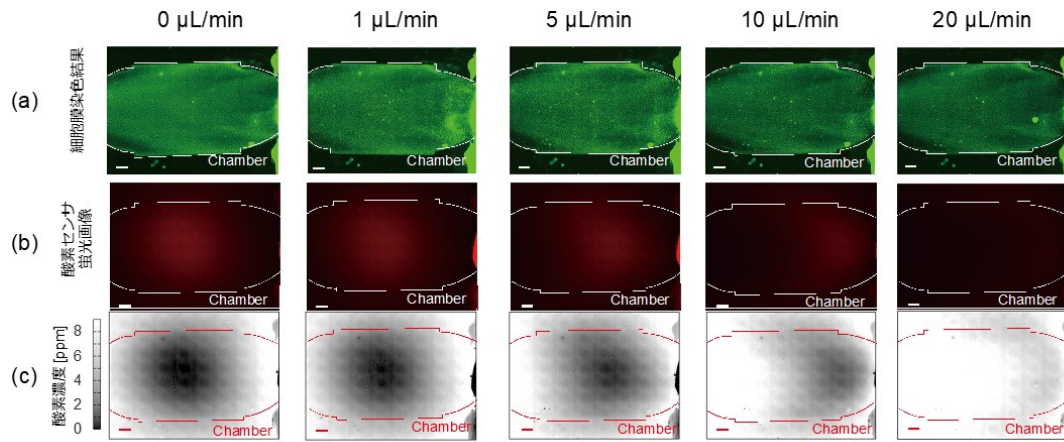


図 4.14 HepG2 培養実験結果. a: PKH67 による細胞膜染色結果. b: 灌流培養後の酸素センサーフィルムの蛍光画像. c: デバイス内酸素濃度分布 (スケールバー : 2 mm).

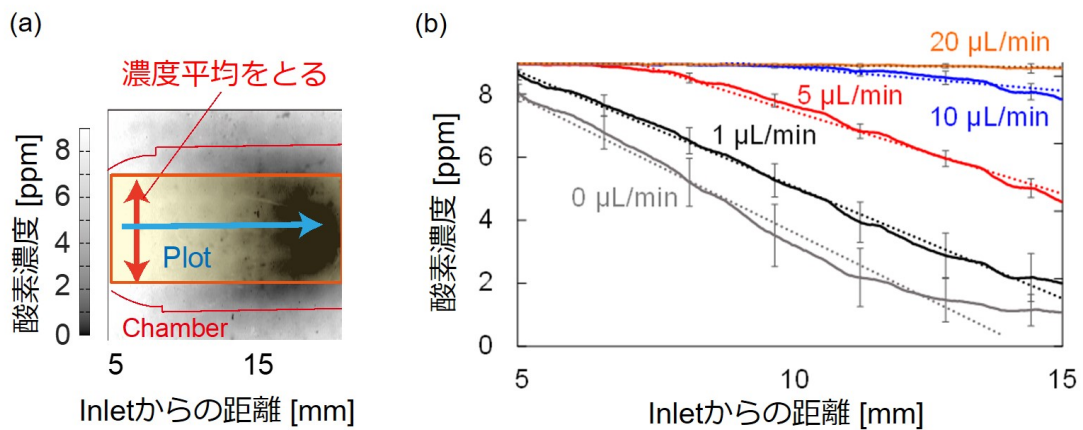


図 4.15 デバイス内酸素濃度勾配の評価 (n=5). a: 酸素濃度勾配の測定方法. b: 灌流する培養液の流量変化に伴う酸素濃度勾配の変化.

表 4.3 実験およびシミュレーションで得られた酸素濃度勾配.

培養液の流量 [ $\mu\text{L}/\text{min}$ ]	酸素濃度勾配 [mmHg/mm]			
	実験結果	酸素消費量を変化させた時のシミュレーションによる結果		
		酸素消費量： $1.0 \times 10^{-16}$ mol/cell	酸素消費量： $6.0 \times 10^{-17}$ mol/cell	酸素消費量： $1.5 \times 10^{-17}$ mol/cell
1	-19	-56	-42	-18
5	-15	-21	-15	-5.0
10	-9.7	-13	-9.4	-2.5
20	-1.4	-8.4	-5.0	-1,2

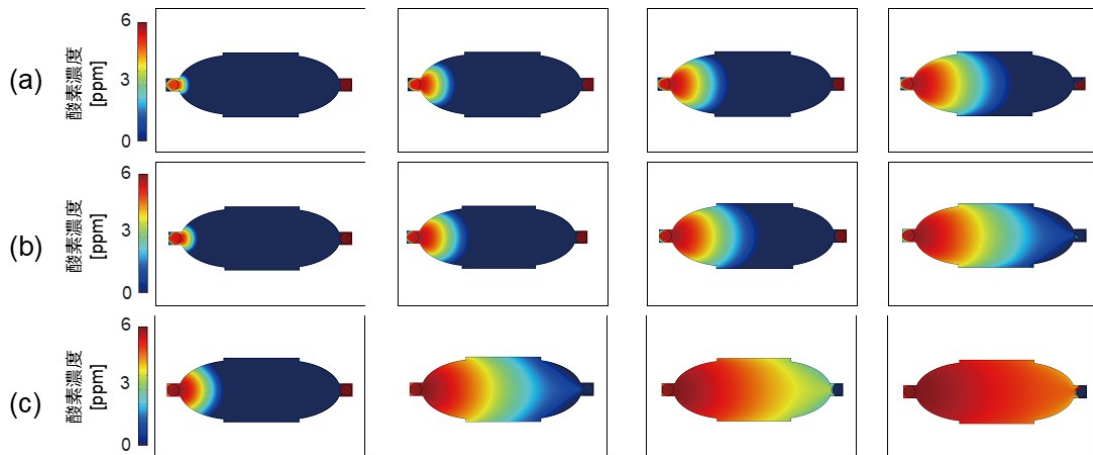


図 4.16 細胞呼吸が各値の場合においての、デバイス内に形成される酸素濃度分布の 2 次元シミュレーション結果. 細胞呼吸の値は a:  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/s/cell, b:  $6.0 \times 10^{-7}$  mol/s/cell, c:  $1.5 \times 10^{-7}$  mol/s/cell.

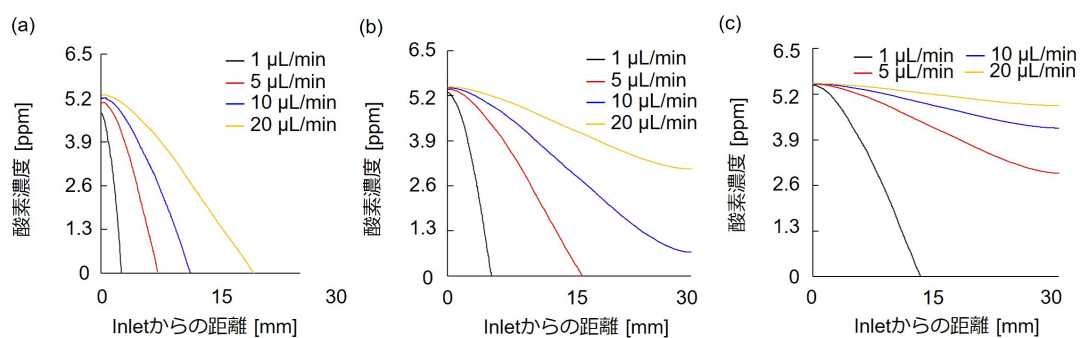


図 4.17 細胞呼吸が各値の場合においての、デバイス内に形成される酸素濃度勾配のシミュレーション結果。細胞呼吸の値は a:  $1.0 \times 10^{-6}$  mol/s/cell, b:  $6.0 \times 10^{-7}$  mol/s/cell, c:  $1.5 \times 10^{-7}$  mol/s/cell.

## 4.4 蛍光色素を用いた RT-qPCR 用デバイスシステムの機能評価

### 4.4.1 実験目的

本研究で作製した RT-qPCR 用デバイスに関して、PBS の流れ（シースフロー, sheath flow）、Trypsin の流れ（リエージェントフロー, reagent flow）を可視化し、流れの実態を確認する。次に、デバイス内で細胞を培養し、Trypsin の代わりに細胞染色液をリエージェントフローとして流すことで、デバイス底面に接着した細胞へ試薬が十分に到達するための、シースフローおよびリエージェントフローの適切な流量を調査する。最後に、実際にリエージェントフローとして Trypsin を流し、局所的に細胞を回収可能であるかの検証を行う。

### 4.4.2 シースフローとリエージェントフローの可視化

RT-qPCR 用デバイスでは、細胞を局所的に回収するために、PBS を Trypsin の後ろから流すことで Trypsin 流れを PBS 流れで包み Trypsin の拡散を防ぐことで、広い流路においても Trypsin の細い流れを形成する。この場合の PBS の流れをシースフロー、Trypsin の流れをリエージェントフローと呼ぶことにする。本デバイスにおいて、シースフローおよびリエージェントフローの形状を可視化し、実際にリエージェントフローの拡散が防がれているか検証する。細胞回収用流路は中央のもの（Inlet 直径が 1 mm のもの）のみ使用した。まず、デバイス全体を PBS で満たし、中央の細胞回収用流路の Inlet と Outlet 以外は栓をした。次に、蛍光色素である Rhodamine 15  $\mu\text{M}$  と Fluorescein 15  $\mu\text{M}$  をそれぞれ中央の細胞回収用流路の PBS 用 Inlet、Trypsin 用 Inlet から流入した。各溶液の流量について、Rhodamine を 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ 、Fluorescein が 0  $\mu\text{L}/\text{min}$  とした。Rhodamine は赤色、Fluorescein は緑色の蛍光を示すため、ガイドフローを赤色蛍光、リエージェントフローを緑色蛍光で観察した。顕微鏡は前節のものと同じものを使用した。

### 4.4.3 Trypsin 用 Inlet の直径とリエージェントフローの関係の検証

本デバイスには細胞回収用流路が 3 本存在するが、細胞の回収時間の短縮および同環境での培養時間の統一のため、細胞回収流路を複数同時に使用して細胞を回収することを目指している。そのため、リエージェントフロー同士が交差しないようにリエージェントフローの幅を十分に細くする必要がある。そこで、リエージェントフローを細くするために Inlet の直径に着目し、Inlet の直径が 1 mm のデバイスと 2 mm のデバイスの 2 種類を作製し、リ

エージェントフローを形成しリエージェントフローの幅を比較した。細胞回収用流路は中央のみ使う場合と3本すべて同時に使う場合の2パターンの実験を行い、3本同時に使用した場合にも、リエージェントフローが交差せず、同時に3か所で細胞の回収が可能か検証した。また、3本同時に細胞回収用流路を使用した場合、各流路において底面に到達する試薬の濃度に差が出るかどうかを、試薬として Fluorescein を流して蛍光輝度を測定することにより検証した。

実験手順に関しては以下に示す。まず、デバイス全体を PBS で満たし、使用する細胞回収用流路の Inlet と Outlet 以外は栓をした。次に、PBS と Fluorescein 15  $\mu\text{M}$  をそれぞれ中央の細胞回収用流路の PBS 用 Inlet, Trypsin 用 Inlet から流入した。各溶液の流量について、PBS を 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , Fluorescein を 10  $\mu\text{L}/\text{min}$  とし、リエージェントフローのみを緑色蛍光で観察した。顕微鏡は前節のものと同じものを使用した。

#### 4.4.4 流れと拡散に関するマルチフィジックス解析

第 4.3.7 項で説明したのと同様のマルチフィジックス解析を行い、培養液の流れと試薬の拡散についてシミュレーションを行った。

#### 4.4.5 結果・考察

##### シースフローとリエージェントフローの可視化

シースフローおよびリエージェントフローの可視化実験の結果を図 4.18 に示す。シースフローが赤色、リエージェントフローが緑色の蛍光で表される。シースフローは中央の流路のみを用いて流しているにもかかわらず、デバイス広範囲に拡散しているが、リエージェントフローは中央の細胞回収用流路にのみ細く直線的に形成された。シースフローの形は、シースフローが存在しない場合のリエージェントフローの形になると考えられるので、シースフローによりリエージェントフローの拡散が防がれることで局所的な流れの形成に成功していることが明らかになった。

##### Trypsin 用 Inlet の直径とリエージェントフローの関係の検証

細胞回収用流路を中央のみ使用した場合のシミュレーション結果、実験結果および両者のリエージェントフローの幅（流れ幅）を比較したものを図 4.19 に示す。シミュレーション結果のカラーバーは Inlet での Trypsin の濃度を 1 とした場合の相対的な Trypsin 濃度を表す。また、実験結果においては緑色蛍光でリエージェントフローが表されている。シミュレーションの場合は図 4.19a 中の黒矢印で示した、デバイス底面での Trypsin の濃度が Inlet から流入する Trypsin の濃度の約 0.4 倍以上となる部分を流れ幅とし、実験の場合は各デバ

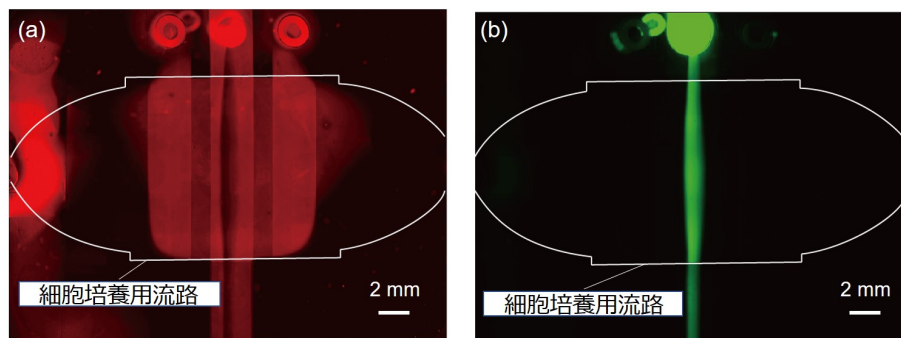


図 4.18 本デバイス内で形成される各流れの可視化. a: Rhodamine によるシースフローの可視化. b: Fluorescein によるリエージェントフローの可視化.

イスにつき図 4.19b 中の 5 点を計測して平均を出して流れ幅とした. 実験に用いたデバイスの個数は各条件で  $n=3$  である. Inlet の直径が 1 mm の場合, シミュレーションにおける流れ幅が  $1.4 \pm 0.3$  mm であったのに対し, 実験では  $1.2 \pm 0.2$  mm であった. Inlet の直径が 2 mm の場合, シミュレーションにおける流れ幅が  $2.0 \pm 0.3$  mm であったのに対し, 実験では  $2.3 \pm 0.1$  mm であった. シミュレーション結果と実験結果の両者において, Inlet の直径が大きいほどデバイス底面でのリエージェントフローの流れ幅が広くなることが示された.

細胞回収用流路を 3 本同時に使用した場合のシミュレーション結果, 実験結果および両者のリエージェントフローの幅を比較したものを図 4.19 に示す. シミュレーション結果のカラーバーは Inlet での Trypsin の濃度を 1 とした場合の相対的な Trypsin 濃度を表す. また, 実験結果においては緑色蛍光でリエージェントフローが表されている. シミュレーションおよび実験結果からの流れ幅の計測方法は前項と同様である. 実験に用いたデバイスの個数は各条件で  $n=3$  である. 3 本のリエージェントフローの流れ幅をそれぞれ個別に計算したものを表 4.4 に示す. 両端と中央の 3 本の流路に形成されたリエージェントフローの流れ幅の平均について, Inlet の直径が 1 mm の場合, シミュレーションにおける流れ幅が  $1.2 \pm 0.01$  mm であったのに対し, 実験では  $1.0 \pm 0.03$  mm であった. Inlet の直径が 2 mm の場合は, シミュレーションにおける流れ幅が  $1.9 \pm 0.06$  mm であったのに対し, 実験では  $1.5 \pm 0.10$  mm であった. シミュレーション結果と実験結果の両者において, 中心の流路のみで実験した場合と同様に, Inlet の直径が大きいほどデバイス底面に届く Trypsin の濃度が濃く, かつ, 流れ幅が広くなることが示された. 同一デバイス内で両端と中央の 3 本のリエージェントフローの流れ幅を比較した場合, 大きな差は見られなかった.

また, 実験結果において, リエージェントフローとして流した Fluorescein の蛍光輝度を Image J を用いて測定し, 表 4.5 に記した. Inlet の直径が 1 mm の場合, 中央のリエージェントフローの輝度は 16.9 [a.u.] であったのに対し, 両端では 7.1 [a.u.] であった. Inlet の直

径が 2 mm の場合、中央のリエージェントフローの輝度は 9.1 [a.u.] であったのに対し、両端では 6.1 [a.u.] であった。各デバイスにおいて、中央の流路のみ両端の流路よりも 1.5~2 倍の輝度を確認した。中央の流路に流れるシースフロー自体の拡散が、両端の流路のシースフローにより抑えられ、より中央に流れるリエージェントフローの拡散を抑える働きが強まったため、両端の流路よりも中央の流路の蛍光輝度が上がる結果が得られたと考えられる。このことから、実際に Trypsin を流した場合、中央の流路は両端の流路よりも Trypsin の濃度が高い状態で細胞に作用することが示唆されるため、3 本の流路を同時に用いる場合は、両端と中央の流路で細胞回収速度に差が出る考えられる。そのため、実験条件をより等しくするためには、中央の流路のみの使用、もしくは両端の流路のみ使用することが本デバイスでは望ましいと考えられる。また、3 本の細胞回収用流路を同時に使用するためには、中央のシースフローに対する両端のシースフローの影響を弱めなくてはならないため、流路同士の間隔を本研究で設計したものよりも広げる必要があると考えられる。

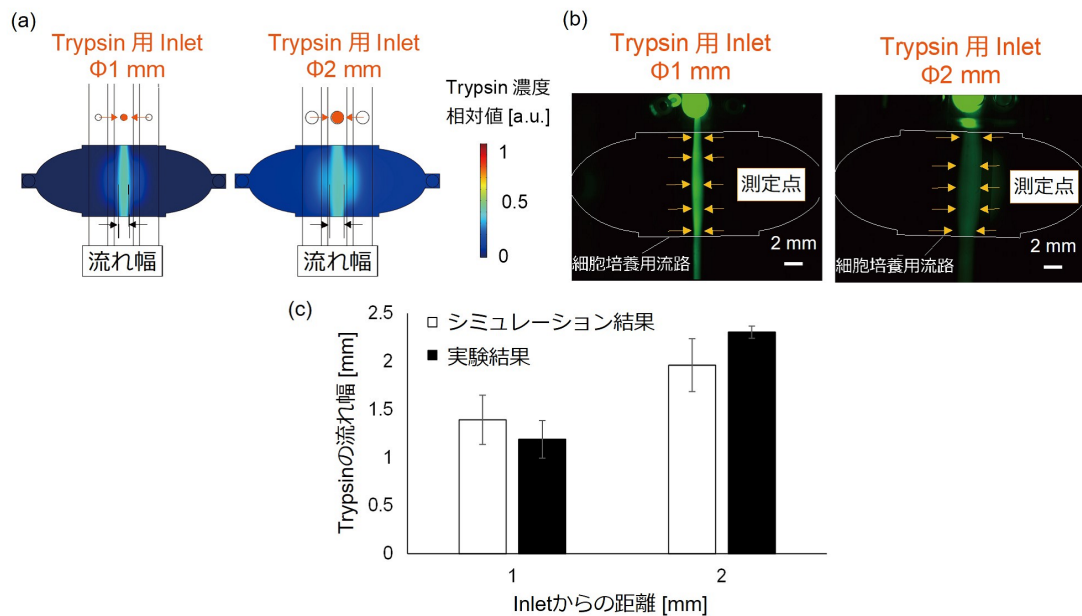


図 4.19 細胞回収用流路を中央のみ使用した場合の、リエージェントフローの幅（流れ幅）。a: シミュレーション結果。b: 実験結果。Trypsin 流れは Fluorescein により可視化されている。c: シミュレーション結果と実験結果の比較 (n=3)。

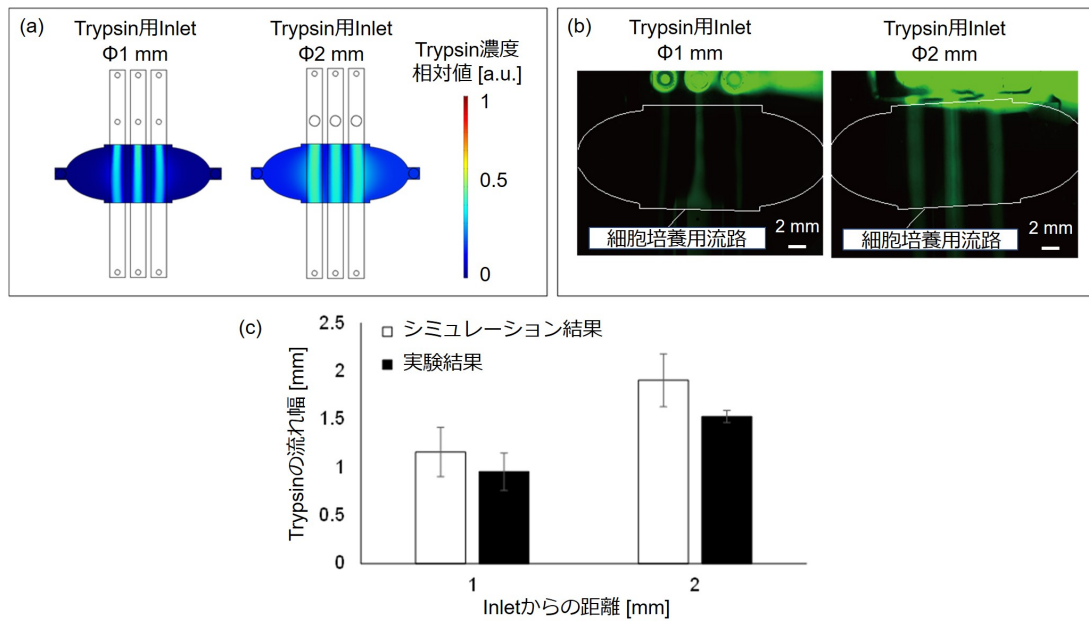


図 4.20 細胞回収用流路を 3 本同時に使用した場合の, Trypsin 流れ幅. a: シミュレーション結果. b: 実験結果. Trypsin 流れは Fluorescein により可視化されている. c: シミュレーション結果と実験結果の比較 (n=3).

表 4.4 3 本の細胞回収用流路に同時に形成したリエージェントフロー (Fluorescein) の流れ幅計測結果 (n=3).

Trypsin 用 Inlet の直径 [mm]	細胞回収用流路に流れるリエージェントフローの流れ幅 [mm]			
	左側流路	中央流路	右側流路	3 流路の平均
1 (シミュレーション)	1.12 ± 0.00	1.21 ± 0.22	1.15 ± 0.00	1.16 ± 0.02
1 (実験)	0.92 ± 0.11	1.03 ± 0.10	0.91 ± 0.05	0.95 ± 0.04
2 (シミュレーション)	2.04 ± 0.00	1.76 ± 0.07	1.91 ± 0.00	1.90 ± 0.07
2 (実験)	1.40 ± 0.06	1.73 ± 0.06	1.45 ± 0.08	1.52 ± 0.10

表 4.5 3 本の細胞回収用流路に同時に形成したリエージェントフロー (Fluorescein) の輝度計測結果 (n=3).

Trypsin 用 Inlet の直径 [mm]	細胞回収用流路に流れる Fluorescein の輝度 [a.u.]	
	両端の流路	中央流路
1	7.1	16.9
2	6.8	9.1



## 4.5 HepG2 を用いた培養実験による PCR 用デバイスシステムの機能評価

### 4.5.1 HepG2 の局所的蛍光染色

試薬がデバイス底面に届くための PBS および試薬の最適な流量を求めるため、細胞回収実験を行う予備実験として、PKH67 を用いた細胞の染色実験を行った。細胞回収用流路の直径が 1 mm であるデバイスを用意し、細胞回収用流路は中央のもののみを使用した。使用した培養液、細胞の播種手順および播種細胞数は同様とした。本実験では細胞を播種した 1 日後に細胞を染色した。細胞染色の手順は以第 4.3 節下である。まず、デバイス全体を血清なしの DMEM 培養液で満たし、使用する細胞回収用流路の Inlet と Outlet 以外は栓をした。次に、PBS と PKH67 をそれぞれ中央の細胞回収用流路の PBS 用 Inlet, Trypsin 用 Inlet から流入した。各溶液の流量について、PBS を 50  $\mu\text{L}/\text{min}$ , PKH67 を 5, 10 $\mu\text{L}/\text{min}$  とし、リエージェントフローのみを緑色蛍光で観察した。顕微鏡は第 4.3 節のものと同じものを使用した。

### 4.5.2 細胞の局所的回収および、回収した細胞の RT-qPCR

#### HepG2 を用いた実験

開発した RT-qPCR 用デバイスを用いて実際に HepG2 および Rat 初代培養肝細胞を回収し、RT-qPCR を行った。HepG2 に関して、使用した培養液、細胞の播種手順および播種細胞数は第 4.3 節と同様とした。灌流培養に関して、細胞回収用流路の直径が 1 mm であるデバイスを 3 個用意し、それぞれにおいて、全ての Inlet および Outlet に栓をして 1 日静置培養した後、細胞培養用流路の Inlet および Outlet を用いて 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  で 2 日間灌流培養を行い、酸素濃度勾配下で HepG2 を培養した。次に、3 本の細胞回収用流路のうち両端の 2 本を用いて HepG2 を回収した。回収手順を以下に示す。まず、デバイス内を PBS で満たし、細胞培養用流路の Inlet および Outlet に栓をした。次に、PBS と 10X Trypsin (Tryple Select Enzyme (10X), Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ中央の細胞回収用流路の PBS 用 Inlet, Trypsin 用 Inlet から流入した。3 個のデバイスのうち 1 個に流す Trypsin にのみ Fluorescein を 15  $\mu\text{M}$  加えて Trypsin 流れの蛍光観察を可能とした。RT-qPCR の結果に Fluorescein が影響を与えることを考慮し、他の 2 個のデバイスに流す Trypsin は Fluorescein を加えず、これらのデバイスにのみ回収した HepG2 の RT-qPCR を行った。RT-qPCR により調査した遺伝子は ARG2, CYP1A1, GCK, HNF4a である。顕微鏡は第 4.3 節のものと同じものを使用した。

### Rat 初代培養肝細胞を用いた実験

Rat 初代培養肝細胞を用いた実験に関しては、酸素濃度勾配の形成と RT-qPCR を行わず、回収が可能であるかどうかの検証のみ行った。Rat 初代培養肝細胞に関して、細胞の播種方法を以下に示す。

まず、作製したマイクロ流体デバイスを脱気した後、流路内を 70% エタノールで満たして滅菌した。次に、デバイス流路内を前章で述べたものと同様のコラーゲン溶液でコーティングしたのち、培養液 (William's E medium (Thermo Fisher Scientific K.K.) に、インスリン (タカラバイオ株式会社) 0.1  $\mu\text{M}$ , デキサメタゾン (和光純薬工業) 1  $\mu\text{M}$ , アスコルビン酸【製造元】500  $\mu\text{M}$ , 上皮成長因子 (Mouse epidermal growth factor, タカラバイオ株式会社) 20 ng/mL, 抗生物質 (Penicillin-Streptomycin-Amphotericin B Suspension ( $\times 100$ ), 和光純薬工業) 1%, 非必須アミノ酸 (MEM Non-Essential Amino Acids Solution (100X), Life Technologies Corporation) 1% となるよう各化合物を加えたもの) でデバイス内を洗浄し、同培養液でデバイスを満たした後、Rat 初代培養肝細胞をデバイス内に播種した。Rat 初代培養肝細胞の適切な播種密度は  $1.0 \times 10^5$  個/cm<sup>2</sup> という報告があり [Xiao 2014], 本デバイスの細胞培養流路の底面積が 2.98 cm<sup>2</sup> であるため、1 デバイスあたりの播種細胞数を  $3.0 \times 10^5$  個とした。播種後、2 時間ごとに培養液を手動で交換し、12 時間静置培養の後に細胞回収実験を開始した。

### 4.5.3 結果・考察

#### HepG2 の局所的蛍光染色

HepG2 の染色結果を図 4.21 に示す。PKH67 の流量が 5  $\mu\text{L}/\text{min}$  の場合は、底面に接着している HepG2 を染色することができなかったが、10  $\mu\text{L}/\text{min}$  の場合は細胞回収用流路の方向に直線状に細胞を染色することに成功した。細胞染色を行ったサンプル数は  $n=3$  であり、各デバイスにおいて染色された領域の幅を 3 点において測定し、その平均値と標準誤差を計算した。細胞が染色された領域の幅は  $820 \pm 24 \mu\text{m}$  であった。このことから、リエージェントフローの流量が少ない場合はデバイス底面に接着している細胞まで試薬が到達しない、もしくは、到達したとしても濃度が不十分で効能が発揮されないことがあることが示唆された。一方で、本デバイスにおいて、シースフローとリエージェントフローを適切な流量に設定することで、底面に接着している細胞までリエージェントが十分に到達し、ミリスケール未満の幅の領域において細胞に試薬を作用させることが可能であることが明らかになった、

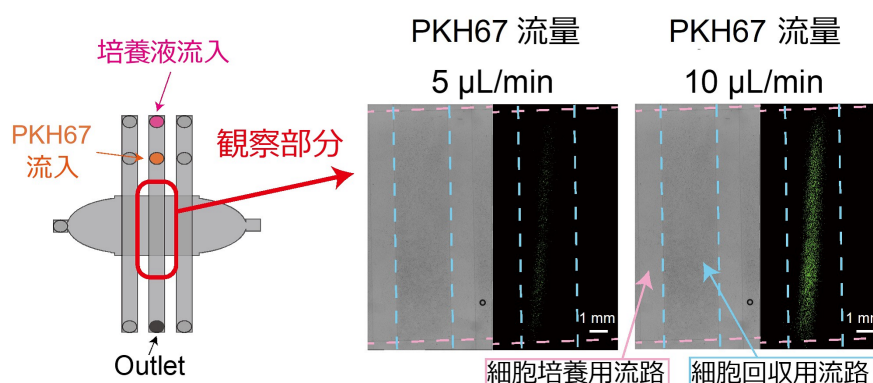


図 4.21 細胞回収用流路に PKH67 を流した場合の細胞染色結果.

### 細胞の局所的回収および、回収した細胞の RT-qPCR

細胞回収直前のデバイスにおける、細胞培養流路の明視野画像とデバイス底面の酸素センサフィルムの蛍光画像をそれぞれ図 4.22a, b に示す. 蛍光画像に関して、酸素濃度が高い部分は蛍光せず、酸素濃度が低い部分ほど赤色蛍光がみられる. 上流側の細胞回収用流路の直下は酸素濃度が高く、下流側の細胞回収用流路直下は酸素濃度が高くなっており、本研究で開発した RT-qPCR 用デバイスにおいて、免疫染色デバイス同様に灌流培養によって酸素濃度勾配を内部に形成可能であると同時に、高酸素領域と低酸素領域の細胞を同時に回収可能であることが示された. 次に、Trypsin による局所的細胞回収の様子を図 4.23 に示す. 左の蛍光画像では、Fluorescein を加えて緑色蛍光で可視化された Trypsin の流れを映しており、左側が同じ位置における名刺や画像を表す. 黄色直線に挟まれた部分が細胞回収流路であり、蛍光画像をから、細胞回収流路内に Trypsin の流れ幅が収まっていることが明らかである. また、蛍光画像と明視野画像の①、②の位置は対応しており、①は Trypsin 流れの境界領域、②は Trypsin 流れから遠く、Trypsin に全く晒されていない領域を指す. ①の領域において、左半分は Trypsin に晒され、右半分は Trypsin にさらされていないが、明視野画像に着目すると、Trypsin にさらされている部分のみ細胞が剥がされ、回収されていることが確認できた. 細胞回収実験前後の明視野画像を比較したものを図 4.24 に示す. 細胞密度に関して、細胞回収前は細胞回収用流路全体に隙間なく細胞が接着していたのに対して、実験後は主に Trypsin 流れの直下に関して細胞密度が低くなっており、細胞が回収されていることが示された.

また、②の領域においては、細胞が回収されることなく、かつ、正常に接着し生存していることが確認できた. この結果から、本研究で開発したデバイスを用いた場合局所的細胞回収に成功したと言える. なお、1本の回収用流路を用いた場合に細胞の回収された領域

の平均面積は約  $16.5 \text{ mm}^2$ ，回収した細胞数の平均は約  $9.7 \times 10^4$  個であった．サンプル数は  $n=4$  である（デバイス2個，各デバイス2本の細胞回収用流路）．細胞の回収にかかった時間は約10分間であった．次に，2個のデバイスから回収した細胞を用いて，RT-qPCRを行った結果を図4.25に示す．PCR結果に関しては，どの遺伝子の発現量も高酸素領域，低酸素領域，およびdishによる静置培養系（Control）で規則的な傾向が見られず，ほとんど差が確認できなかった．これは，HepG2が肝がん由来の細胞株であるため，肝代謝機能が正常な肝細胞と異なること，Rat初代培養肝細胞やヒトiPS由来の肝細胞などと比べて肝代謝機能が極端に弱くなる傾向にあることが原因と考えられる．そのため，RT-qPCRを行い肝代謝機能を観察するためには，HepG2ではなくRat初代培養肝細胞を使用する必要がある．これは免疫染色実験においても同様であると考えられる．しかし，Rat初代培養肝細胞はTrypsin等で細胞を回収することが不可能であるため，Trypsinの代わりにTrizol等の細胞を融解・破碎させる試薬をデバイス内に流し，細胞の溶解液を回収する必要があると考えられる．

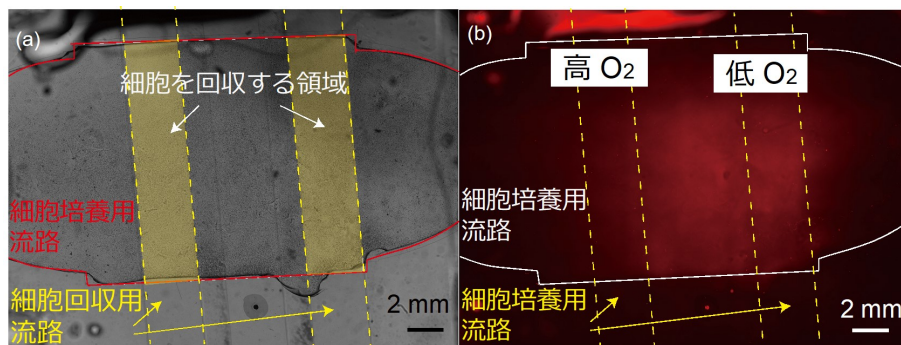


図 4.22 細胞回収前の細胞培養流路全体の様子．a: 細胞培養用流路の明視野画像．b: デバイス底面の酸素センサフィルムにより，細胞培養用流路の酸素濃度分布を表した蛍光画像．

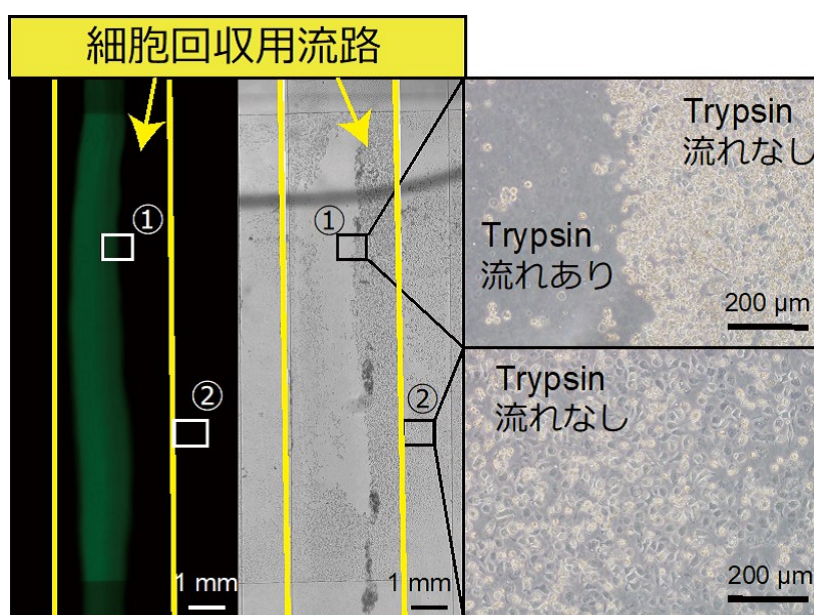


図 4.23 局所的細胞回収実験結果. a: デバイス 1 から採集した細胞に関する RT-qPCR 結果. b: デバイス 2 から採集した細胞に関する RT-qPCR 結果.

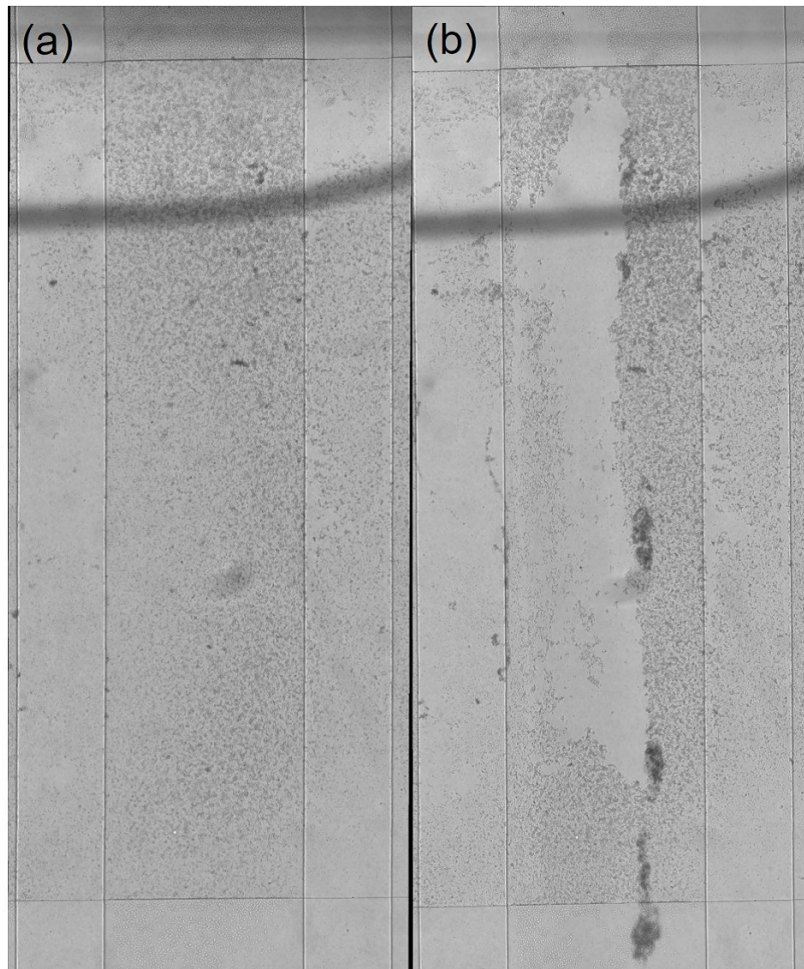


図 4.24 局所的細胞回収実験前後の明視野画像の比較. a: 細胞回収前の細胞回収用流路付近の明視野画像. b: 細胞回収後の細胞回収用流路付近の明視野画像.

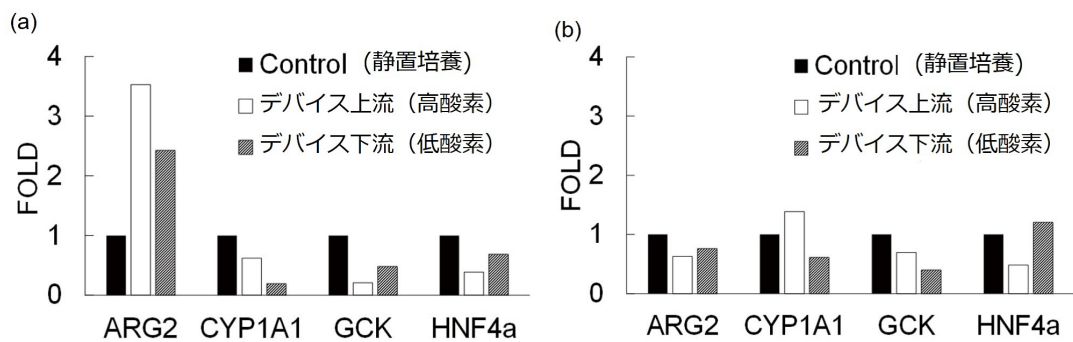


図 4.25 回収した細胞の PCR 結果.

## 4.6 結言

本章では、免疫染色用デバイス、RT-qPCR 用デバイスの2種類のデバイスを設計開発し、その機能評価を行った。免疫染色用デバイスおよび RT-qPCR 用デバイスの両者において、内部で肝細胞を培養しながら酸素濃度勾配を形成することに成功した。免疫染色用デバイスを用いた検証実験では、設計したデバイスにおいて培養液の流量により酸素濃度勾配を制御可能であることを明らかにした。RT-qPCR 用デバイスを用いた検証実験では、シースフローおよびリエージェントフローの流れを可視化し、実際に広い流路内の一部にマイクロスケールで局所的に試薬を作用させ、細胞の染色や回収を行うことが可能であることを示した。次章では、免疫染色用デバイスを用いて、Rat 初代培養肝細胞を培養し、酸素濃度勾配と肝代謝機能の関係を調査する。





## 第 5 章

# Rat 初代培養肝細胞培養実験

---

5.1	緒言 .....	108
5.2	Rat 初代培養肝細胞を用いた免疫染色実験 .....	109
5.2.1	実験目的 .....	109
5.2.2	Rat 初代培養肝細胞の単離とデバイス内培養 .....	109
5.2.3	タンパク質の免疫染色 .....	109
5.2.4	使用した顕微鏡および画像処理方法.....	111
5.3	結果・考察.....	113
5.3.1	Rat 初代培養肝細胞を培養した場合のデバイス内酸素濃度勾配 ....	113
5.3.2	免疫染色結果 .....	114
5.4	結言 .....	119

---

## 5.1 緒言

本章では，本デバイスシステムを用いて細胞の機能評価を行うために，HepG2 より生体内の肝細胞に近い機能を保持する Rat 初代培養肝細胞を用いた灌流培養実験を行う．前章で HepG2 を培養した場合と同様にして，本研究で開発した免疫染色デバイス内で Rat 初代培養肝細胞を培養し，細胞呼吸によりデバイス内部に酸素濃度勾配を形成する．そして，デバイス上流すなわち高酸素濃度の領域と，デバイス下流すなわち低酸素濃度の領域でのタンパク質の発現を，免疫染色を用いて観察・比較評価を行う．

## 5.2 Rat 初代培養肝細胞を用いた免疫染色実験

### 5.2.1 実験目的

酸素濃度勾配下で Rat 初代培養肝細胞を培養し、デバイス上流すなわち高酸素濃度の領域と、デバイス下流すなわち低酸素濃度の領域におけるタンパク質の発現の様子を比較する。

### 5.2.2 Rat 初代培養肝細胞の単離とデバイス内培養

Rat 初代培養肝細胞は生後 8 週目のオスの Wistar Rat（三協ラボサービス株式会社）から、二段階コラゲナーゼ灌流手順によって摘出した [Seglen 1976]。Trypan blue を用いた染色により生存率を評価し、生存率 75% 以上の肝細胞を培養に用いた。細胞の播種方法は 4.5.2 節と同様に行った。

まず、予備実験として、Rat 初代培養肝細胞を用いて酸素濃度勾配の形成が可能であることを示すために、免疫染色するものとは別に Rat 初代培養肝細胞を播種したデバイスを用意し、培養液の流量を 5, 10, 15, 20  $\mu\text{L}/\text{min}$  で、それぞれ 30 分間灌流培養を行った。そして、各流量で培養した場合において酸素濃度分布および酸素濃度勾配の計測を行った。酸素濃度分布および酸素濃度勾配は、前章で述べた方法と同様の方法を取った。本実験として免疫染色するものは、細胞播種直後から 3 時間の静置培養を行い、細胞が十分に接着した後、1 日間または 2 日間 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  で灌流培養を行った。

### 5.2.3 タンパク質の免疫染色

1 日間または 2 日間の灌流培養が終了した後、細胞の免疫染色を行った。まず、デバイスを PBS で満たすことで細胞を洗浄する。デバイス内の細胞を洗浄する場合は常に前述の方法を用いた。PBS による洗浄の後、4% パラホルムアルデヒド (PFA, 和光純薬工業) をデバイスに満たした状態で 15 分間室温で静置し、細胞を固定した。次に、デバイス内を PBS で洗浄し、0.2% Triton X-100 (Sigma Aldrich) をデバイスに満たした状態で 15 分間室温で静置し投下処理を行う。そして、デバイス内を PBS で洗浄し、Animal-Free Blocker 5X (Vector laboratories) を 5 倍希釈したブロッキング溶液で満たし、1 晩 4  $^{\circ}\text{C}$  で静置しブロッキングを行った。ブロッキング終了後、ブロッキング溶液を用いて 1000 倍に希釈した 1 次抗体でデバイス内を満たし、4  $^{\circ}\text{C}$  で一晩静置する。そして、デバイス内を PBS で洗浄し、ブロッキング溶液を用いて 500 倍に希釈した 2 次抗体でデバイスを満たし 3 時間室温で静置したのち、PBS を用いて 1000 倍希釈した DAPI (和光純薬工業) で満たし、15 分室

温で静置し核染色を行った。その後、デバイス内を PBS で洗浄し、蛍光観察を行った。観察したタンパク質は、Albumin (Alb), 低酸素誘導因子 (HIF-1  $\alpha$ ), Glutamine synthetase (GS), Glucokinase (GCK), betacatenin, Cytochrome P-450 3A2 (CYP3A2), Adenomatous Polyposis Coli (APC), Phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) の 8 種類である。このうち *in vivo* で中心静脈側すなわち低酸素領域に多く発現するものは、HIF-1  $\alpha$ , GS, GCK, betacatenin および CYP3A2, 肝動脈側すなわち高酸素領域に多く発現するものは、APC および PCK1 である。Alb は肝細胞を示す指標として使用する。また、HIF-1  $\alpha$  は低酸素応答の指標として使用する。それぞれのタンパク質の関わる代謝を表 5.1 に示す。また、使用した 1 次抗体および 2 次抗体のリストを表 5.2, 表 5.3 に示す。

表 5.1 代謝に関係するタンパク質について、それぞれの発現領域と関連する肝代謝機能。

観察したタンパク質	<i>in vivo</i> で多く発現する領域	関連する肝代謝機能
GS	中心静脈側 (低酸素領域)	グルタミン合成, アンモニアの代謝
GCK	中心静脈側 (低酸素領域)	解糖系
betacatenin	中心静脈側 (低酸素領域)	血中グルコース濃度の調節
CYP3A2	中心静脈側 (低酸素領域)	解毒作用
APC	肝動脈側 (高酸素領域)	腫瘍抑制, 血中グルコース濃度の調節
PCK1	肝動脈側 (高酸素領域)	糖新生

表 5.2 使用した 1 次抗体一覧。

観察したタンパク質	1 次抗体の製品番号	由来種	交差種
Alb	(From Cappel)	Goat	Rat
HIF-1 $\alpha$	ab8366	Mouse	Rat, Human, Mouse, Cow
GS	ab49873	Rabbit	Rat, Mouse, Monkey
GCK	ab37796	Rabbit	Human, Rat
betacatenin	ab2365	Rabbit	Rat, Human, Mouse, Chicken
CYP3A2	sc-271033	Mouse	Rat, Human, Mouse
APC	sc-9998	Mouse	Rat, Human, Mouse
PCK1	ab115693	Goat	Human, Rat

表 5.3 使用した 2 次抗体一覧.

2 次抗体	2 次抗体の製品番号	由来種	交差種
Alexa Fluor 488	A11055	Donkey	Goat
Alexa Fluor 488	ab150105	Donkey	Mouse
Alexa Fluor 568	A10042	Donkey	Rabbit
Alexa Fluor 647	ab150131	Donkey	Goat
Alexa Fluor 647	ab150107	Donkey	Mouse

## 5.2.4 使用した顕微鏡および画像処理方法

培養細胞の拡大明視野画像に関しては、倒立顕微鏡 (Olympus IX71, Olympus) と 10 倍対物レンズ (UPLFLN 10X2, Olympus) を用いて撮影した。細胞培養流路内の酸素濃度の観察に関しては、倒立顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) を使用し、蛍光顕微鏡像を撮影して画像の輝度値から蛍光強度を解析した。蛍光顕微鏡像の撮影には、4 倍対物レンズ (CFI Plan Apo  $\lambda$  4x, KEYENCE), BZ-X フィルタ (Texas Red, KEYENCE) を用いた。撮影フレームの露光時間は 0.2 秒とした。灌流開始直前、灌流開始から 1 時間後、24 時間後、48 時間後に内部の酸素濃度を計測するため蛍光観察を行った。画像の撮影方法と画像処理に関して、上記の蛍光顕微鏡では 1 枚の写真でデバイス全体を映すことは不可能だったため、各デバイスについて隙間なく  $9 \times 9$  枚の画像を自動で撮影し、イメージジョイント機能を用いて位置合わせを行いながら連結し、デバイス全体の画像を撮影した。撮影した酸素センサの蛍光画像に関しては、Gnuplot を用いて蛍光輝度を酸素濃度に変換した。その後、Image J を用いて Inlet からの距離に対する酸素濃度の変化を計測し、酸素濃度勾配を評価した [Schneider 2012]。

免疫染色結果に関しては、DAPI での染色後速やかに共焦点顕微鏡 (Olympus IX81, Olympus) (Olympus FV3000, Olympus) および 10 倍対物レンズ (UPLFLN 10X2, Olympus) を使用して撮影した。高酸素領域と低酸素領域の免疫染色結果を比較するために、以下の方法で正規化を行った。DAPI は細胞核を染色するため、DAPI により染まる領域の面積は細胞数に近似できる。各領域で得られた DAPI の画像を 2 値化し (図 5.1a), 2 値化した画像の輝度  $I_{DAPI}$  を求めて、核の占める領域面積とした。一方、免疫染色画像は Image J を用いて死細胞等の自家蛍光によるノイズを除去したのち、その輝度  $I_{protein}$  を求めた (図 5.1b)。そして、 $I_{protein}$  を  $I_{DAPI}$  で除算することにより、およその細胞数により正規化された輝度  $I$  を求め、これをタンパク質の発現量とした。

$$\frac{I_{protein}}{I_{DAPI}} = I \quad (5.1)$$

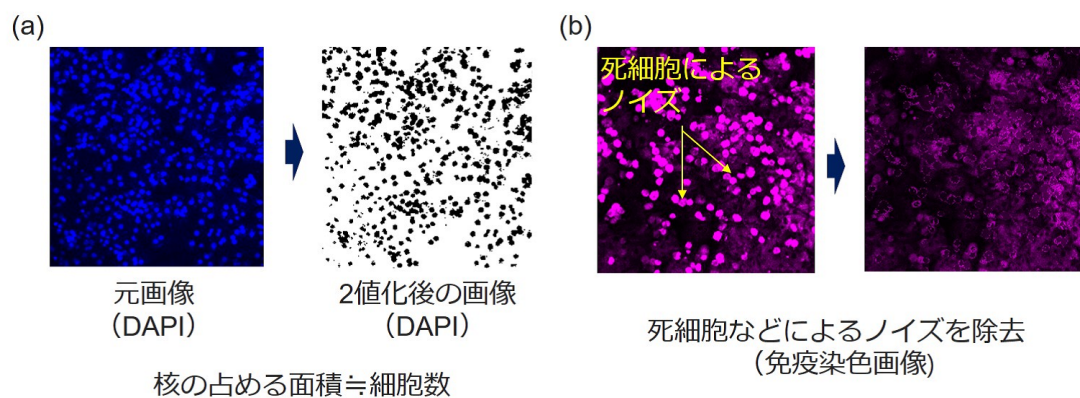


図 5.1 画像処理方法. a:核染色画像の2値化. b:免疫染色画像のノイズの除去.

## 5.3 結果・考察

### 5.3.1 Rat 初代培養肝細胞を培養した場合のデバイス内酸素濃度勾配

本研究で開発した免疫染色用デバイスに関して、Rat 初代培養肝細胞を各流量で 30 分培養した場合の、デバイス内部の酸素センサの蛍光画像およびそこから計算した酸素濃度分布を図 5.2 に、そこからプロットした酸素濃度勾配のグラフを図 5.3 に示す。サンプル数は  $n=3$  である。HepG2 の時と同様、デバイス内に酸素濃度勾配を形成することに成功し、流量が多いほど酸素濃度勾配が緩やかになる傾向が確認できた。このことから、本デバイスは Rat 初代培養肝細胞を培養する場合においても内部の酸素濃度勾配を流量によって制御可能であることが示された。

次に、免疫染色用に 2 日間培養したデバイスの酸素濃度勾配のグラフを図 5.4 に示す。この場合、培養液の流量は  $15 \mu\text{L}/\text{min}$  に統一されている。グラフより、時間が経過するにつれて、酸素濃度勾配が緩やかになっていることが明らかになった。本デバイスは細胞呼吸のみにより酸素濃度の勾配を形成するため、酸素濃度勾配が緩やかになっていることは細胞の呼吸量が低下していることを意味する。Rat 初代培養肝細胞において、酸素濃度の低い下流において細胞活性が悪くなり呼吸量が低下していると考えられる [Foy 1994]。

*In vivo* に関して酸素濃度勾配を形成する他の要因に関しては詳細な検討が必要であるが、酸素濃度勾配の形成には細胞呼吸が大きく起因していると考えられている。そのため、細胞呼吸により形成される酸素濃度勾配に着目した本デバイスにおいて形成される酸素濃度勾配の動態は *in vivo* に近い可能性が考えられる。*In vivo* において酸素濃度勾配が一定に保たれ

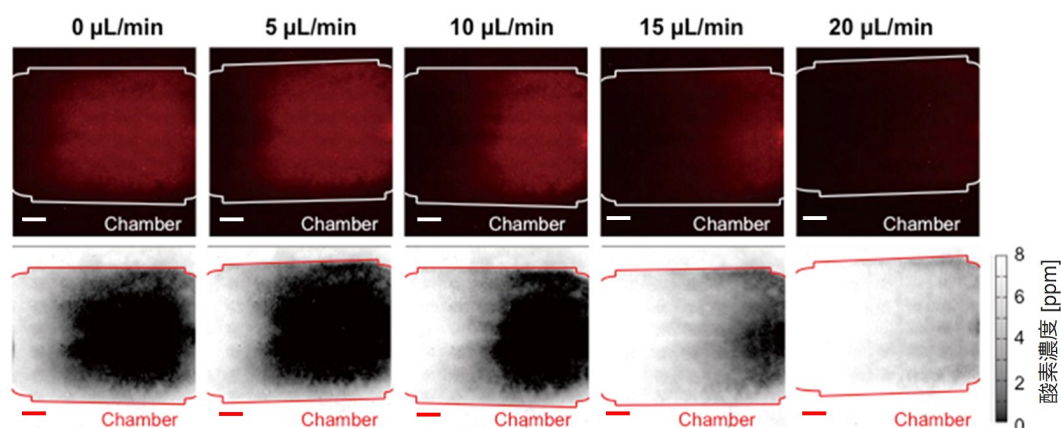


図 5.2 Rat 初代培養肝細胞の培養時に、各流量において 30 分で形成されたデバイス内酸素濃度分布（スケールバー：2 mm）。

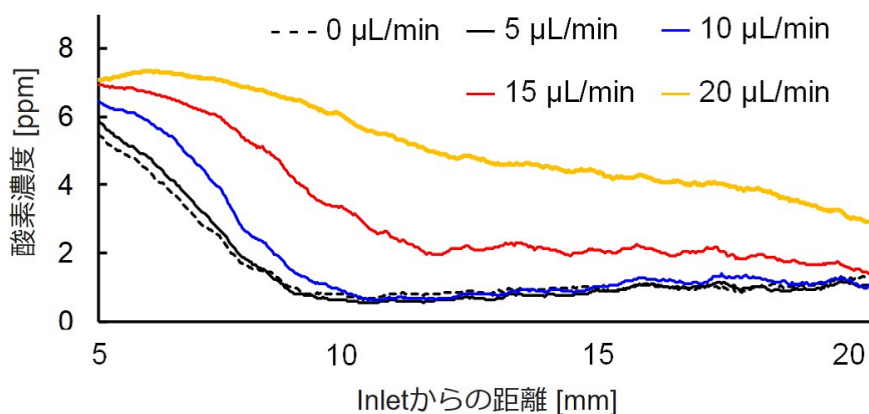


図 5.3 Rat 初代培養肝細胞の培養時に、各流量において 30 分で形成されたデバイス内酸素濃度勾配 (n=3).

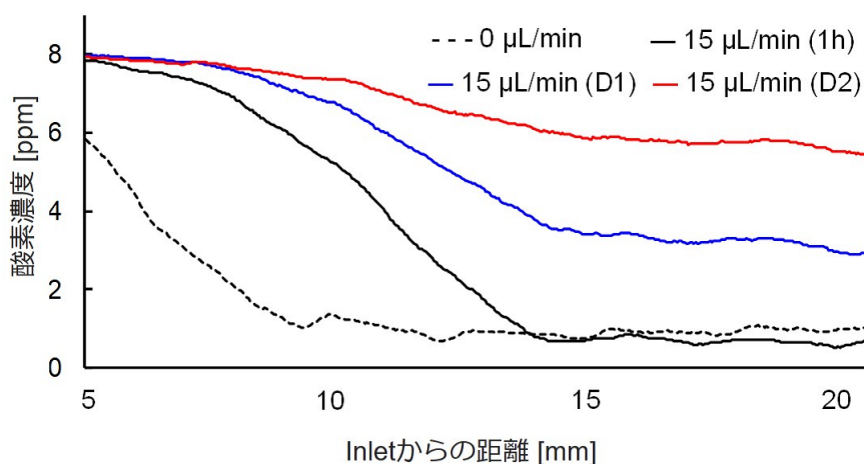


図 5.4 Rat 初代培養肝細胞の培養時に形成されたデバイス内酸素濃度勾配の時間経過 (n=3).

ているとすると、D2 以降本デバイス内の酸素濃度勾配も同様に収束する可能性があるため、D3 以降の観察・検証の必要性が考えられる。

### 5.3.2 免疫染色結果

1 日間の灌流培養後の免疫染色により得られた画像を図 5.5 に示す。Rat 初代培養肝細胞は細胞密度が増加し細胞同士の接触が十分な場合、コンタクトインヒビションが起こり、細胞分裂を停止する [Machide 2006]。そのため、本実験で観察している Rat 初代培養肝細胞



はモノレイヤーであると考えてよい。まず、高酸素領域と低酸素領域の両方に Alb が満遍なく発現している。このことから、デバイス全体にわたって肝細胞が十分に機能していることが示唆される。低酸素応答を示す HIF-1  $\alpha$  は高酸素領域に比べ、低酸素領域のほうが強く発現していることが見て取れる。このことから、本デバイスでは要した場合に Rat 初代培養肝細胞は、*in vivo* 同様、低酸素領域のみ正しく低酸素応答を示すことが明らかとなった。その他の画像に関して、GS および CYP3A2 は高酸素領域に比べて低酸素領域での発現が多いように見受けられ、これは *in vivo* における傾向と同じである。細胞数に関して、上流よりも下流においての細胞数が多くなっているが、これは灌流した培養液の流れに乗って死細胞や弱った細胞が下流のほうへ流されたのだと考えられる。上流と下流の細胞数に差が出ているため、細胞数もしくは細胞の占める面積を用いて実験結果を正規化する必要がある。免疫染色結果を DAPI による核染色結果から画像内に細胞核の占める割合を算出し、算出したで除算し、より定量的に評価したものを図 5.6 に示す。図中のエラーバーは標準誤差を示す。灌流培養を完了した 3 個のデバイスを用意し、デバイス 1 では Alb, GS, および HIF-1  $\alpha$ , デバイス 2 では PCK1, GCK, および CYP3A2, デバイス 3 では PCK1 (2 回目), betacatenin, および APC に関して免疫染色を行った。各デバイスの上流と下流それぞれ 3 点ずつ観察し、細胞数による正規化込みで取得画像の輝度の平均値と標準誤差を算出した。本デバイス内において、HIF-1  $\alpha$ , GS, GCK, CYP3A2 は低酸素領域のほうが発現量が高く、APC は高酸素領域のほうが発現量が高い傾向にあった。これらの 5 種類のタンパク質は *in vivo* と同様の発現傾向を確認できた。一方で、デバイスによって差が出た PCK1 や、上流のほうが発現量が多かった betacatenin など、*in vivo* と同様の発現傾向を確認できなかったものも存在した。考えられる原因として、1 日という培養期間が短くタンパク質の発現量に十分に差がつかなかった可能性があげられる。

次に、2 日間の灌流培養により得られた免疫染色結果を図 5.7 に示す。2 日間の灌流培養実験において、1 日間の培養で *in vivo* 同様の傾向が得られた例として CYP3A2, *in vivo* 同様の傾向が得られなかった例として betacatenin を選択し、免疫染色を行ったところ、CYP3A2, betacatenin の両者において、低酸素領域である下流のほうが高酸素領域である上流に比べて多く発現する傾向が見られた。サンプル数は  $n=3$  である。このことから、1 日間の灌流培養時に高酸素領域と低酸素領域でのタンパク質の発現量に全体的に差がつかなかった理由として、培養時間が短かったことが有力となり、2 日間灌流培養を行うことで、高酸素領域と低酸素領域でのタンパク質の発現量に差をつけることが可能であると示唆される。D2 において、図 5.4 より、下流の細胞の呼吸量の低下により酸素濃度勾配自体は緩くなっているが、肝代謝に領域特異性が見られるようになることから、日数経過により勾配が緩くなっているにもかかわらず D2 では zonation が D1 よりも再現されていることが示唆される。

本実験の時間的スケールに関する考察に関して、2 日間の灌流培養が免疫染色の観察に十

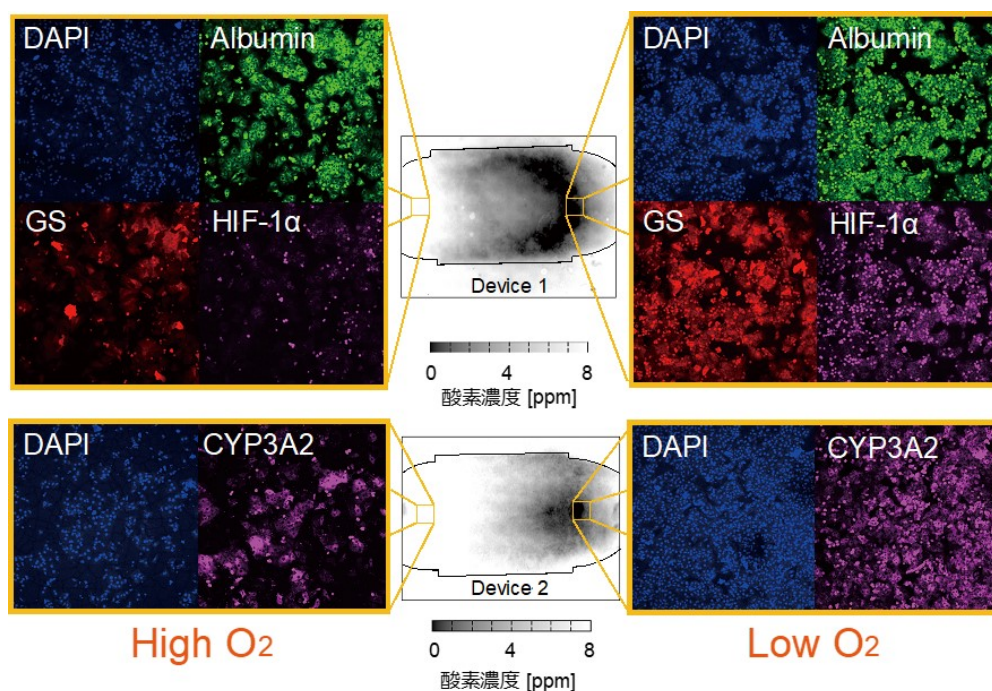


図 5.5 1 日間培養後の、デバイス内酸素濃度分布と上流および下流における各タンパク質の発現を表す蛍光画像（スケールバー：200  $\mu\text{m}$ ）。

分であるかの議論が必要である。RT-qPCR を用いて mRNA を観察するには 1 時間～数時間で発現のピークを迎えるため、1～2 日間の培養でも十分であると考えられる。免疫染色によってタンパク質の発現を観察する場合は、mRNA の発現よりも数時間遅れてピークを迎える。2 日間の培養が意味を持つかに関しては、2 日間培養後に肝細胞のタンパク質の発現に領域的な差異が見られ、zonation が形成されてくることを示唆しているため、本実験系においては意味があると考えられる。ただし、観察しているのはタンパク質の発現であるため、細胞活性などに関してさらに突き詰めるには、時間経過とともに観察できるライブセルイメージングなどの実験が必要であると考えられる。

勾配の変化と遺伝子発現の変化の関係性や、ライブセルイメージングを通して細胞応答を観測すると、より zonation と酸素濃度勾配の関係性が明らかになると考えられる。具体的に考えられる方法を以下に挙げる：

1. デバイスを複数個用意し、半日～1 日に 1 回ごとに 1 デバイスずつ順番に細胞を固定し、それぞれについて免疫染色を行い、差分を観察する。
2. 非侵襲的な方法で数分から 30 分単位の細胞活性を見ることが可能な方法があれば、その方法を用いて観察を行う。
3. 細胞活性をリアルタイムで観察することができれば、酸素濃度勾配の変化による活

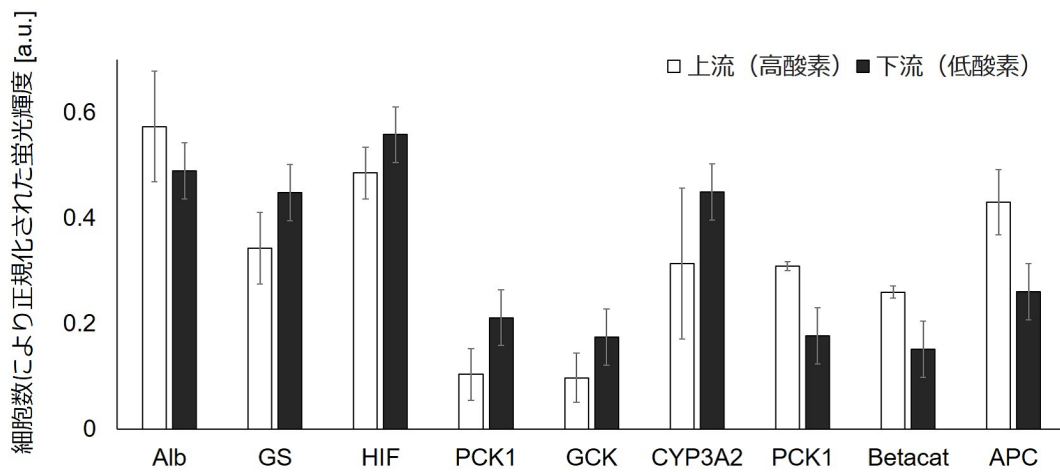


図 5.6 1 日間培養後の各タンパク質の発現結果の比較。

性的変化の有無を確認することで、酸素濃度勾配の変化や遺伝子発現の変化の理由が明確になると考えられる。例えば、細胞内のカルシウムイオン濃度を測定し、ホルモン分泌のバランスと細胞応答を調べる方法や、CYP 遺伝子の前後に GFP 遺伝子を導入し、リアルタイムで CYP 遺伝子の発現量を観察する方法が存在する。

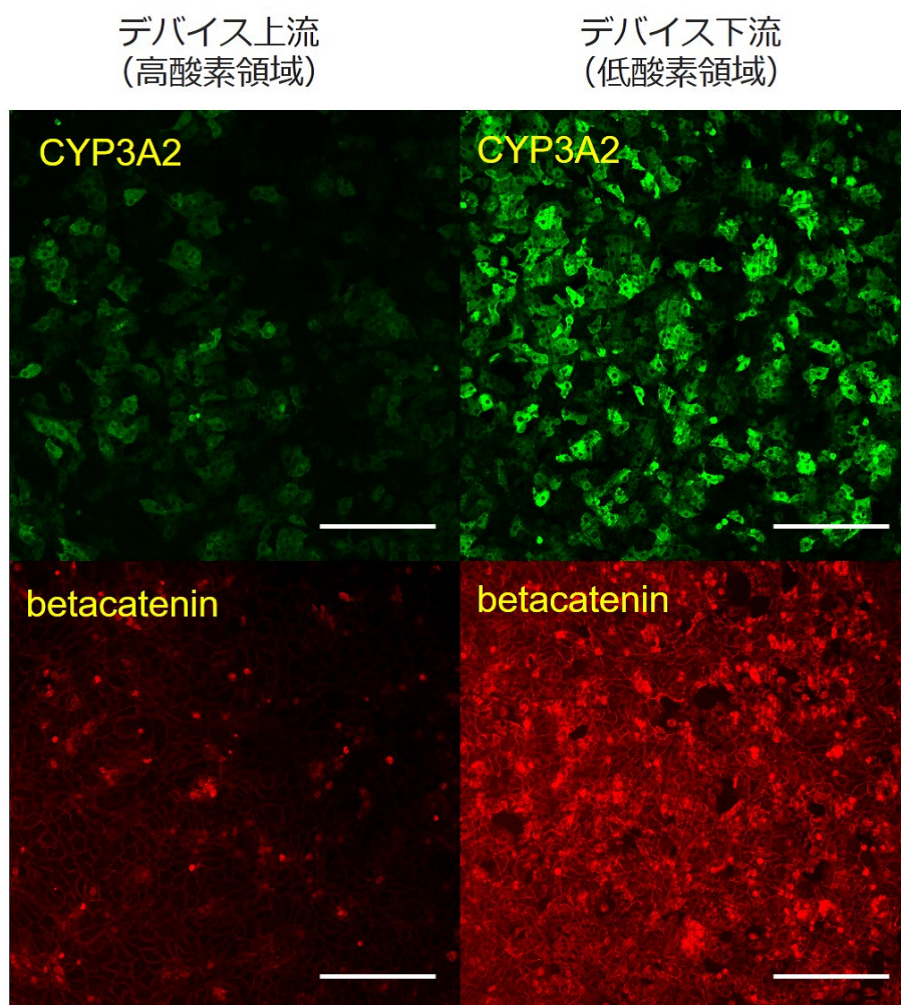


図 5.7 2 日間培養後の，デバイス上流と下流における CYP3A2 および betacatenin の免疫染色結果の比較（スケールバー：200  $\mu\text{m}$ ）。

## 5.4 結言

本章では、まず、Rat 初代培養肝細胞を本デバイスシステムを用いて培養し、HepG2 培養時と同様に酸素濃度勾配を形成・制御が可能であることを示した。次に、デバイス内に酸素濃度勾配を形成した状態で培養した細胞について、肝代謝機能に関連するタンパク質の免疫染色を行うことで、デバイス上流の高酸素領域とデバイス下流の低酸素領域の肝代謝機能の比較を行った。その結果、本デバイスシステムを用いて *in vivo* に類似したタンパク質の発現傾向を再現可能であることを明らかにした。次章では、本デバイスシステムを用いて、酸素濃度勾配下の Rat 初代培養肝細胞に薬物代謝実験を行う。



## 第 6 章

# Rat 初代培養肝細胞に対する Phenacetin を用いた毒性試験

---

6.1	緒言 .....	122
6.2	実験目的 .....	123
6.3	Phenacetin を含む培養液を用いた Rat 初代培養肝細胞の灌流培養 .....	123
6.4	コントロール条件としての, Phenacetin を含む培養液を用いた Rat 初代 培養肝細胞の静置培養 .....	124
6.5	DCFDA による ROS の可視化 .....	124
6.6	使用した顕微鏡および画像処理方法 .....	125
6.7	結果・考察 .....	126
	6.7.1 DCFDA による ROS の可視化 .....	126
	6.7.2 免疫染色結果 .....	127
6.8	結言 .....	131

---

## 6.1 緒言

本研究の目指すところは、新薬開発における新しい *in vitro* 試験方法である。そのため、本研究で開発したデバイスは薬物実験に使用可能であることが望ましい。そこで、本章では、本研究で開発した免疫染色用デバイスを用いて Rat 初代培養肝細胞を酸素濃度勾配下で培養しながら薬物代謝実験を行う。*In vivo* において肝臓で代謝される Phenacetin を培養液に加えてデバイスに流し、高酸素領域と低酸素領域での細胞応答を比較する。



## 6.2 実験目的

本研究で開発した免疫染色用デバイスを用いて Rat 初代培養肝細胞を酸素濃度勾配下で培養しながら薬物代謝実験を行い，高酸素領域と低酸素領域での細胞応答を比較する。

## 6.3 Phenacetin を含む培養液を用いた Rat 初代培養肝細胞の灌流培養

デバイス内に投薬する薬物は 100  $\mu$ M Phenacetin を用いる。Phenacetin は *in vivo* において，肝臓でアセトアミノフェンを経てグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体へと代謝され排泄される。Phenacetin がアセトアミノフェンに代謝される際に，ヒトであれば CYP3A4，Rat であれば CYP3A2 の発現が活発になる。また，アセトアミノフェンがグルクロン酸抱合体及び硫酸抱合体に代謝される際に，活性酸素（Reactive Oxygen Species, ROS）が多く発生する（図 6.1）。また，Phenacetin の代謝は解毒に含まれるため，*in vivo* において静脈側の低酸素領域で行われる。

以上から，本研究で開発したデバイスを用いて肝細胞を培養し，Phenacetin を投与したものと投与していないものを比較した場合，デバイス下流の低酸素領域で CYP3A2 がより多く発現していればデバイス内で Phenacetin がアセトアミノフェンに，ROS がより多く発現していれば，アセトアミノフェンがグルクロン酸抱合体および硫酸抱合体に代謝されている可能性が考えられる。

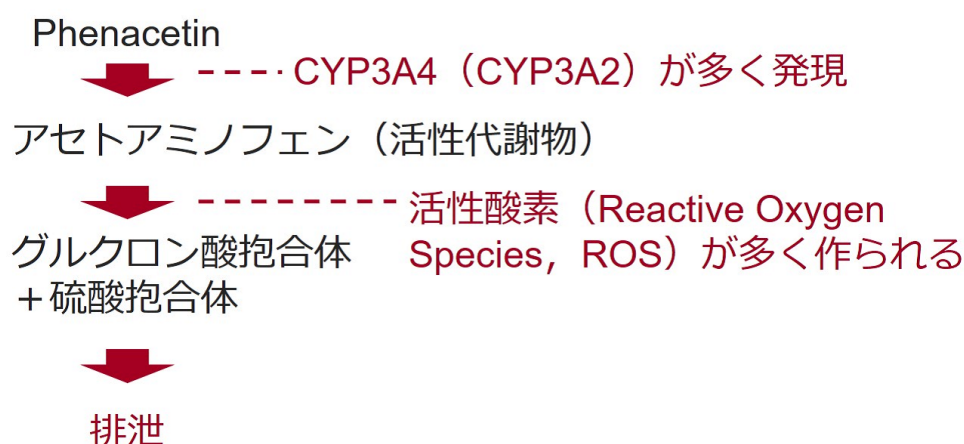


図 6.1 Phenacetin の肝臓内での代謝経路.

実験手順を以下に示す。まず、Rat 初代培養肝細胞を免疫染色用デバイスに播種した。使用する培養液、細胞播種手順および播種細胞数は前章と同様とした（1 デバイスあたりの播種細胞数は  $3.0 \times 10^5$  個）。3 時間から 12 時間の静置培養ののち、1 日間灌流培養を行った。静置培養の時間は Rat 初代培養肝細胞の収集率と接着具合を鑑みて、適宜適正な時間に変更を行った。3 時間以上の静置培養の場合は、2 時間毎にデバイス内の培養液の交換を手動で行った。次に、今度は通常の培養液ではなく、濃度が  $100 \mu\text{M}$  となるように Phenacetin (Sigma Aldrich) 添加した培養液に変えてさらに 1 日間灌流培養を継続し、その後細胞の環境応答の評価に移った。細胞の環境応答の評価に関しては、免疫染色および DCFDA による活性酸素 (Reactive Oxygen Species, ROS) の観察を行った。免疫染色方法に関しては前章と同様の方法を取った。

### 6.4 コントロール条件としての、Phenacetin を含む培養液を用いた Rat 初代培養肝細胞の静置培養

コントロール条件として、ノントリートの 96 ウェルプレートデバイス同様にコーゲンコートし、1 日間通常の培養液で静置培養した後に、濃度が  $100 \mu\text{M}$  となるように Phenacetin 添加したものに変えてさらに 1 日間静置培養を行った。培養後はデバイス内培養細胞同様 ROS を測定したのち、細胞を固定し、免疫染色を行った。

### 6.5 DCFDA による ROS の可視化

DCFDA による ROS 染色は、DCFDA / H2DCFDA - Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay Kit (Abcam) (ROS 測定キット) を用いて、デバイスと 96 ウェルプレートの両者において、上記の ROS 測定キットにより ROS の発現量を蛍光顕微鏡を用いて観察した後、細胞の固定および免疫染色に移った。デバイスの細胞に関して ROS を観察する手順は以下である。灌流培養が終了したデバイスを PBS で満たして洗浄したあと、ROS 測定キット内の 1X buffer で満たす。次に、ROS 測定キット内の DCFDA solution で同様にデバイス内を満たし、 $37^\circ\text{C}$  で 45 分間、遮光しながら静置する。45 分後速やかにデバイスを PBS で満たして洗浄し、蛍光顕微鏡で観察を行った。静置培養系の細胞に関して ROS を観察する手順は以下である。まず培養液をアスピレートし、ROS 測定キット内の 1X buffer でウェルを洗浄した。次に、1X buffer をアスピレートし、DCFDA solution でウェルを満たし、 $37^\circ\text{C}$  で 45 分間、遮光しながら静置した。最後に DCFDA solution をアスピレートし、PBS でウェルを満たして速やかに蛍光顕微鏡で観察を行った。

## 6.6 使用した顕微鏡および画像処理方法

ROS の観察に使用した顕微鏡は倒立顕微鏡 (BZ-X710, KEYENCE) で観察し, 蛍光顕微鏡像を撮影して画像の輝度値から蛍光強度を解析した. 蛍光顕微鏡像の撮影には, 4 倍対物レンズ (CFI Plan Apo  $\lambda$  4x, KEYENCE), BZ-X フィルタ (GFP, KEYENCE) を用いた. 撮影フレームの露光時間は 0.05 秒とした. また, 培養細胞の拡大明視野画像に関しては, 倒立顕微鏡 (Olympus IX71, Olympus) と 10 倍対物レンズ (UPLFLN 10X2, Olympus) を用いて撮影した. 免疫染色結果に関しては, DAPI での染色後速やかに共焦点顕微鏡 (Olympus IX81, Olympus) (Olympus FV3000, Olympus) および 10 倍対物レンズ (UPLFLN 10X2, Olympus) を使用して撮影した.

## 6.7 結果・考察

### 6.7.1 DCFDA による ROS の可視化

まず、各インキュベータ内の酸素濃度と、その中に設置して細胞を培養した 96 ウェルプレート底面の D2 における酸素濃度の対応表を表 6.1 に示す。測定されたウェル底面の酸素濃度は、実際に細胞が晒されている酸素濃度であると考えられる。酸素濃度の測定には蛍光式酸素センサ (Robust Oxygen Probe OXROB3, Pyro Science) を使用し、測定方法としては、センサの表示する酸素濃度が 1 分間安定したのを確認したのち、次の 1 分間の酸素濃度の測定値の平均値を求めた。

以上を踏まえて、96 ウェルプレートに播種した Rat 初代培養肝細胞に関して、各培養条件における細胞の明視野画像を図 6.2、ROS 染色結果を図 6.3 に示す。図 6.2、6.3 に関して、それぞれスケールバーは 200  $\mu\text{m}$ 、2 mm を示し、上段が Phenacetin を投与していないコントロール条件の ROS 染色結果、下段が Phenacetin を投与した条件の ROS 染色結果となる。各条件ごとに比較した場合、Phenacetin を投与したものと投与していないもので明確な差は見られなかった。このことから、単一環境で Rat 初代培養肝細胞を培養した場合は、Phenacetin が正常に代謝された可能性は低いことが考えられる。比較検討したウェル数は各酸素濃度条件において、Phenacetin 有りが 4 個、Phenacetin 無しが 4 個である。また、異なる酸素濃度条件間で比較を行った場合、酸素濃度が 0.5%、3.0% の場合よりも 11.3%、12.6% の場合の方が ROS が多く発現する傾向が見られた。図 6.2 より、酸素濃度が 0.5%、3.0% の場合よりも 11.3%、12.6% の場合の方が細胞の接着が強固であり伸展がみられるため、細胞活性の差によって ROS の発現量に差が出ているのではないかと考えられる。

次に、Rat 初代培養肝細胞をデバイスに播種し灌流培養した場合の、酸素センサの蛍光画像および ROS 測定結果を図 6.4 に示す。図 6.4 において、a に Phenacetin 投与無し (コント

表 6.1 各インキュベータで設定した酸素濃度と、実際にその中に設置した 96 ウェルプレートで Rat 初代培養肝細胞を培養した場合の D2 におけるウェル底面の酸素濃度の関係。

インキュベータで設定された酸素濃度 [% ]	ウェル底面の酸素濃度 [% ]
2.5	0.5
5.0	3.0
10.0	11.3
20.0	12.6

ロール条件)での酸素センサの蛍光画像, b にコントロール条件での ROS の染色結果, c に Phenacetin 投与有りでの酸素センサの蛍光画像, d に Phenacetin 投与有りでの ROS の染色結果を示す. デバイスにおける ROS 染色のサンプル数は  $n=2$  である. Phenacetin の投与の有り無しで比較した場合, 酸素濃度勾配に大きな変化は見られなかったが, Phenacetin を投与したものにおいて ROS が多く発現した. 図 6.5 に各条件における細胞の明視野画像を示す. どちらのデバイスにおいても上流・下流ともに細胞の接着が強固で伸展がみられているため, ROS の発現量の変化は Phenacetin の投与により生じている可能性が考えられる.

### 6.7.2 免疫染色結果

免疫染色結果を図 6.6, 図 6.7 に示す. 免疫染色のサンプル数は各条件において  $n=3$  である. CYP1A2, betacatenin においては大きな変化は見られなかったが, Phenacetin を投与したもののほうが, 投与していないものよりも CYP3A2 が下流において多く発現する傾向が示された. CYP3A2 は, ラットの生体内で Phenacetin が肝細胞によってアセトアミノフェンに代謝される際に多く発現することが知られている, この結果から, 本研究で開発したデバイス内において, 肝細胞を灌流培養しながら Phenacetin を投与した場合, Phenacetin がアセトアミノフェンに代謝されている可能性が示された.

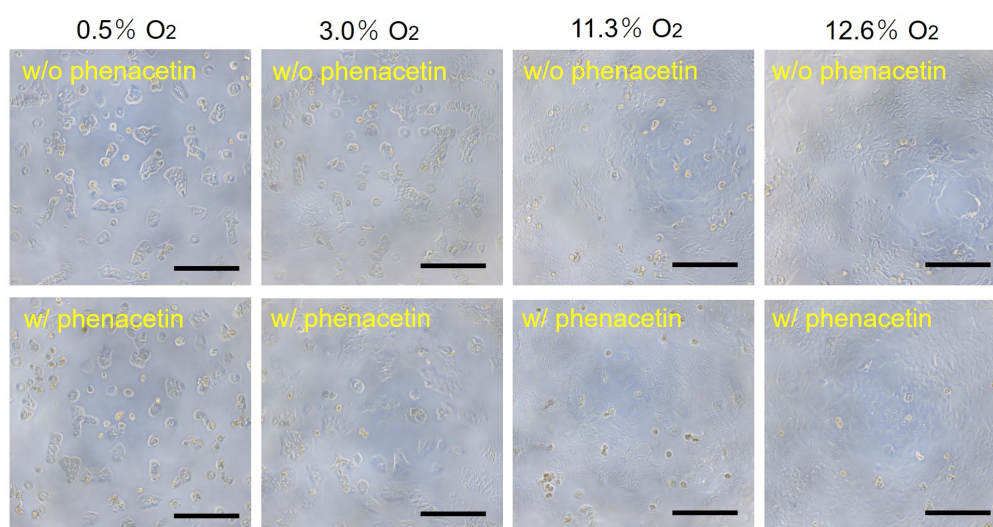


図 6.2 96 ウェルプレートを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における, 各酸素濃度条件での細胞の明視野画像 (スケールバー: 200  $\mu\text{m}$ ).

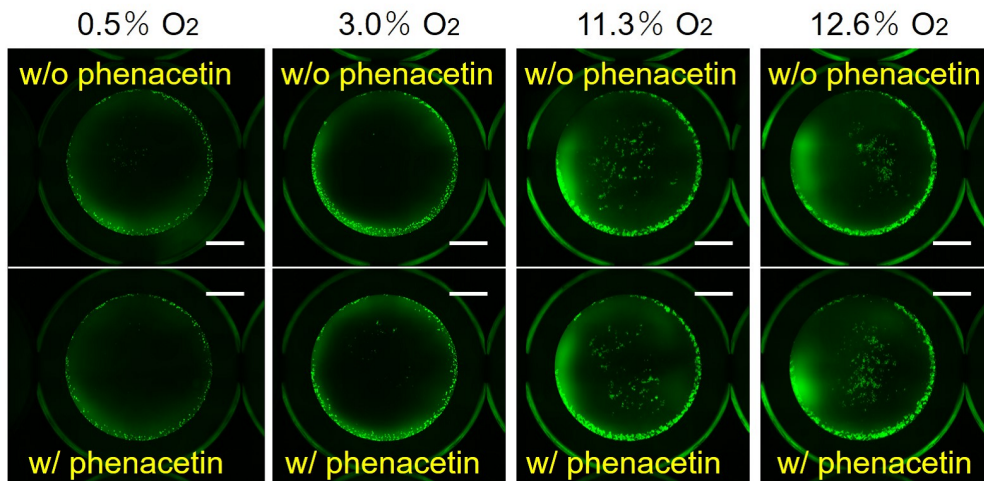


図 6.3 96 ウェルプレートを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における、各酸素濃度条件での ROS (活性酸素) 染色結果 (スケールバー : 2 mm).

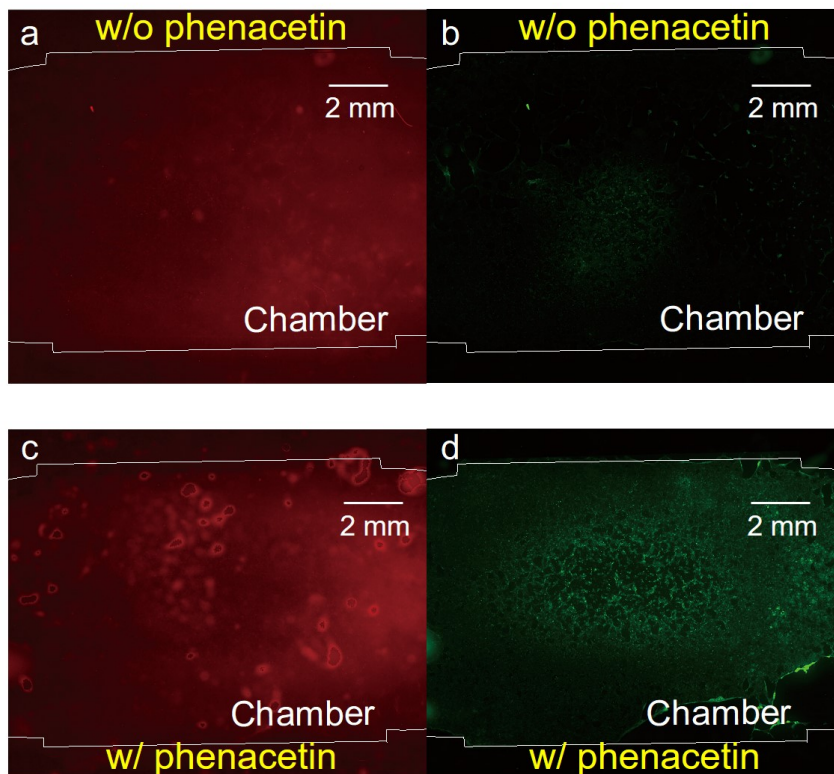


図 6.4 開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における、各酸素濃度条件での酸素センサの蛍光画像 (a,c) と ROS (活性酸素) 染色結果 (b,d). a,b: Phenacetin 投与無し, c,d: Phenacetin 投与有り.

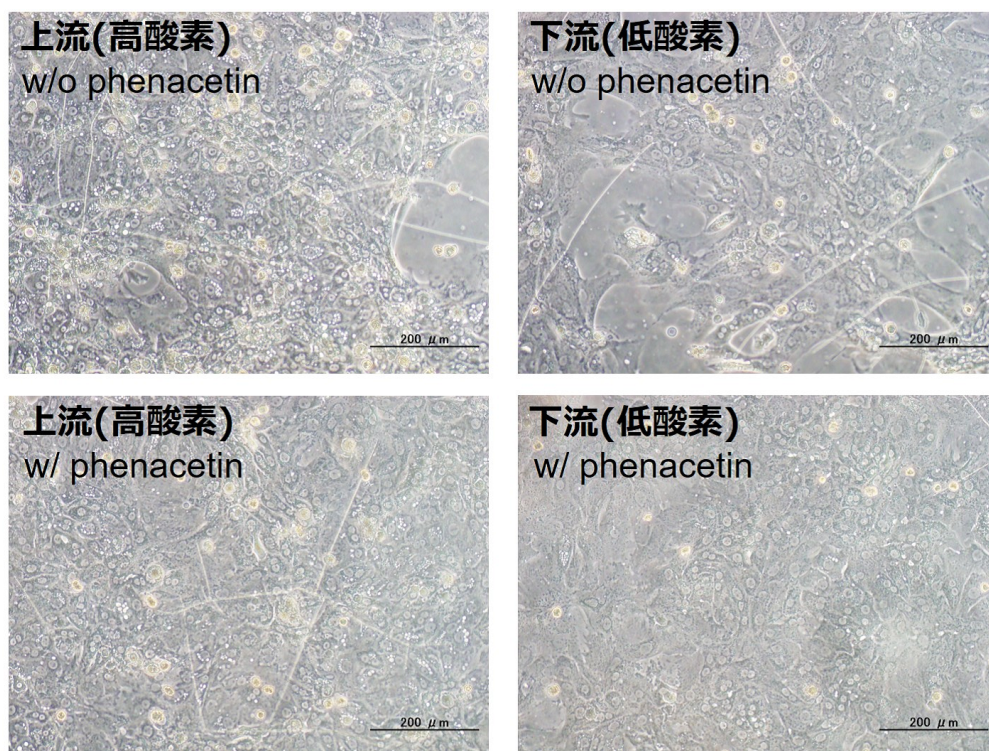


図 6.5 開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各酸素濃度条件での細胞の明視野画像（スケールバー：200  $\mu\text{m}$ ）．上段が Phenacetin 投与無し，下段が Phenacetin 投与有り．

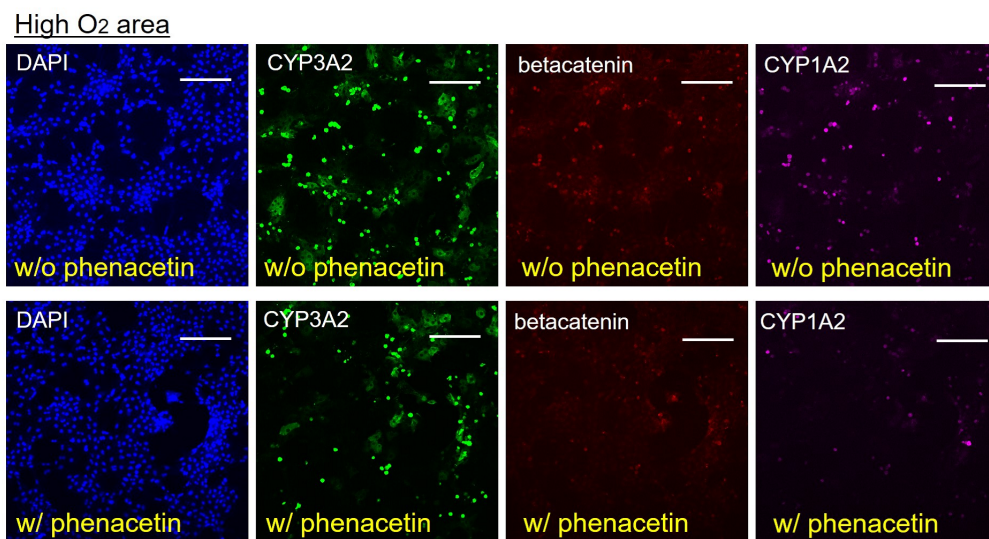


図 6.6 開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における，各デバイス上流（高酸素領域）の免疫染色結果．上段が Phenacetin 投与無し，下段が Phenacetin 投与有り（スケールバー：200  $\mu\text{m}$ ）．

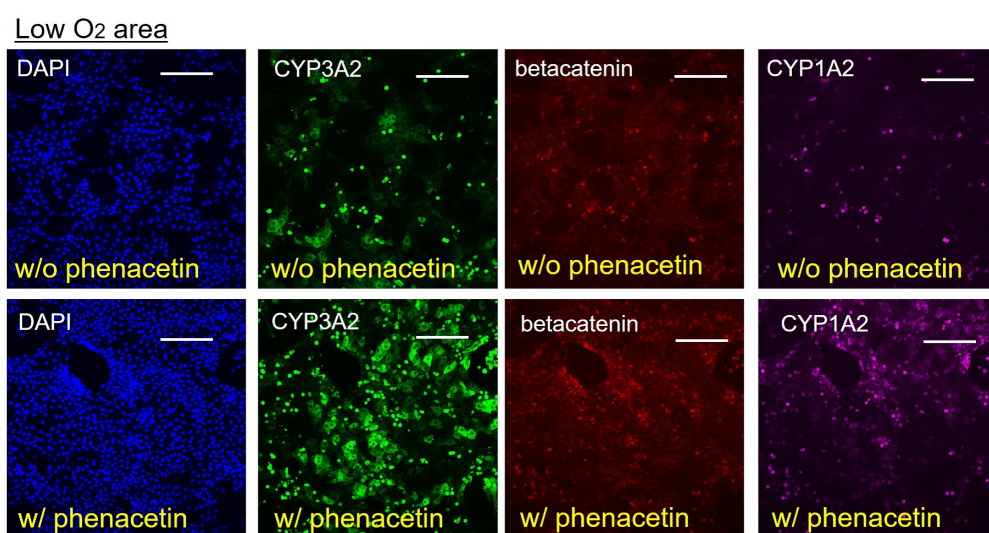


図 6.7 開発したデバイスを用いた Rat 初代培養肝細胞培養実験における、各デバイス下流（低酸素領域）の免疫染色結果. 上段が Phenacetin 投与無し, 下段が Phenacetin 投与有り（スケールバー：200  $\mu$ m）.



## 6.8 結言

本章では、開発した免疫染色用デバイスを用いて、Rat 初代培養肝細胞に対して薬物実験を行った。本デバイスシステムを用いて、肝臓で代謝される解熱鎮痛剤の一種である Phenacetin を薬物として投与した場合、デバイス下流の低酸素領域において CYP3A2 の発現量が高まった。このことから、本デバイスシステムを用いることで、Phenacetin のアセトアミノフェンへの代謝を再現可能であることが示唆された。また、本デバイス内では低酸素環境においても Rat 初代培養肝細胞に十分な接着及び伸展がみられるため、ROS の測定時に細胞活性による差を考慮する必要がなくなることが示唆された。次章では、第 5 章から 7 章までを総括し、本研究の全体的な考察を行う。



## 第 7 章

# 考察

---

7.1	緒言 .....	134
7.2	考察 .....	135
7.3	結言 .....	139

---

## 7.1 緒言

本章では、zonation を実現する肝細胞培養システムの製作および機能評価（4章）と、それを用いた Rat 初代培養肝細胞の培養実験、毒性試験の結果（5, 6章）の結果を踏まえて、本研究全体の考察を行う。

## 7.2 考察

本研究では、ドラッグスクリーニングにおいて、動物実験の代替法となる新しい *in vitro* 試験方法の開発を目指す。 *In vitro* において肝機能の再現は困難であるという課題を解決するため、肝臓内で形成される酸素濃度勾配に着目し、酸素濃度勾配を利用して zonation が発生する肝細胞培養デバイスシステムの開発を目指している。

また、本研究では、肝細胞培養から解析までを簡便に行えるデバイスシステムの開発を目標とするため、酸素濃度勾配および細胞周囲の酸素濃度と肝細胞の個々の代謝機能や遺伝子発現の関係を空間的に可視化することをデバイス設計要件とした。3次元培養系は2次元培養系よりも生体内環境に近いと見なされ、細胞活性や遺伝子発現などを再現するには一般的に3次元培養系のほうが2次元培養系よりも適していると考えられているが [No 2015]、スフェロイドなどの細胞の3次元構造において、内部の酸素濃度を計測することや、スフェロイド全体における酸素濃度分布の可視化は困難であるため、酸素濃度勾配や酸素濃度分布と細胞活性などの関連性を明確に調査することが困難であると考えられる [Kieninger 2018]。肝小葉を模倣して酸素濃度勾配を形成できた否かを酸素濃度分布の計測により確かめるには、肝小葉の構造を2次元的に展開して酸素濃度勾配を形成し、それを2次元平面上で可視化することが現実的であると考えられる。そこで、本研究では2次元培養型のデバイスシステムの開発を行った。

デバイス内酸素濃度測定方法には、電気化学的手法と蛍光測定法の2種類が主に存在するが [Oomen 2016]、電気化学的手法では、灌流培養系において流路全体の酸素濃度を測ることしかできず、局所的に酸素濃度を測定するには、多少細胞活性に影響が出てしまうことを考慮しても、蛍光測定方法をとらざるを得ないと考えられる。そのため、本研究では蛍光測定方法を採用する。また、蛍光測定によりデバイス全体の酸素濃度を可視化するには、蛍光輝度にむらが出ないよう一様なシート状のセンサ上に細胞を播種する必要がある。そのため、本デバイスの形状は扁平であり、底面には凹凸のない酸素センサフィルムを設置している。

デバイスシステムの設計に関して、本研究で開発したデバイスシステムは、肝臓における酸素濃度勾配と物質の流れの両方を模倣しており、酸素の減少する方向に物質が流れていく設計を行った。そのため、特定の物質デバイス内に流入し代謝を試みる場合、酸素濃度勾配に対して代謝産物の流れる方向が *in vivo* と同様のため、より *in vivo* に近い代謝を観察することが可能であると考えられる。また、本研究では、免疫染色用デバイスシステムと RT-qPCR 用デバイスシステムの2種類を開発した。免疫染色法ではデバイス全体を視覚的に観察するため細胞一つ一つの位置関係を把握しつつ解析可能であるという利点がある

が、画像処理を必要とし、ノイズ等の影響から定量的な分析を行うことが難しい。一方で、RT-qPCR法ではより詳細な解析を定量的に行うことができるが、一定量の細胞を回収した際に1細胞同士の詳細な位置関係がわからなくなってしまう。そのため、解析するタンパク質および遺伝子発現の対象と使用する細胞を考慮して、実験ごとにより適切なものを使用することで、幅広い実験とデータの収集が可能となると考えられる。

第4章における、HepG2を用いた実験では、開発したデバイス内において肝細胞を培養した際に細胞呼吸依存で酸素濃度勾配を形成可能であることが検証できた。それを踏まえて第5章でRat初代培養肝細胞を用いた実験を行うことで、HepG2を用いた実験で検証できなかった肝機能に対する考察を行うことが可能となった。

第4, 5章の実験結果を総括すると、本デバイスシステムでは、細胞の種類にかかわらず、細胞培養時に内部で酸素濃度勾配を形成可能であることが示された。また、流入する培養液の流量を決定することで酸素濃度勾配に再現性を持たせることができること、流量を増やすことで酸素濃度勾配が緩やかになり流量を減らすことで酸素濃度勾配が急になることが明らかになった。このことから、本デバイスシステムにおける酸素濃度勾配の形成方法を用いると、細胞にかかるせん断応力が細胞に負荷をかけない範囲で、流量を調節することで任意の酸素濃度勾配を形成することが可能であることが示唆される。また、形成される酸素濃度勾配および内部の酸素濃度分布は30分程度で安定することが確認できている。酸素センサの感度に関しては、3章のキャリブレーションにおいて、200  $\mu\text{L}/\text{min}$  で液体を灌流した場合に23分程度で蛍光輝度が安定した。4章以降での灌流速度は0~20  $\mu\text{L}/\text{min}$  であり、キャリブレーションに比べて低速であるため鉛直下向きの拡散速度が速くなり、23分より早く蛍光輝度が安定すると考えられる。以上を踏まえると、5章におけるRat初代培養肝細胞の実験において灌流開始から観察までの最短時間が1時間であり、この場合は十分にデバイス内部の酸素濃度分布とセンサの蛍光輝度が安定してから観察を行っていると言える。

本デバイスの細胞の播種密度に関して、灌流培養時のせん断応力から肝細胞を守るために流路が広がっているため、若干の不均一性が存在する。しかし、デバイス全体の酸素濃度の勾配を観察した場合、流量を変えた場合の酸素濃度の勾配が一定の範囲内で安定しているため、酸素濃度勾配を培養液の流量で制御する点においては、細胞の不均一性が無視できる範囲だと考えられる。

第4, 5章の実験結果を比較すると、HepG2よりもRat初代培養肝細胞を培養した場合のほうが酸素濃度勾配が急であり、HepG2の1  $\mu\text{L}/\text{min}$  での灌流培養時に形成される酸素濃度勾配とRat初代培養肝細胞の5  $\mu\text{L}/\text{min}$  での灌流培養時に形成される酸素濃度勾配に類似している。これは、Rat初代培養肝細胞の酸素消費量が、HepG2の4倍であることを考慮すると妥当な結果であるといえる。

肝臓内の酸素分圧は15~50 mmHgであり、これをppmに換算するとおよそ0.7~2.2

ppm である。これに対して、第 4, 5 章の培養実験における実験条件ではデバイス上流が約 8 ppm, 下流が 0 ppm である。肝臓内の酸素濃度勾配にデバイス内の酸素濃度勾配を近づけることを考えると、上流の濃度を下げるには第 3 章で提案した酸素濃度制御システムをデバイスの上流に接続すればよいが、上流から下流にかけての酸素濃度勾配を緩やかにするには、培養液の流量を多くしなくてはならない。

特に Rat 初代培養肝細胞培養時には HepG2 よりも酸素消費量が大きいため、流入する培養液の流量をより多くしなくてはならず、細胞にかかるせん断応力が強すぎて細胞に負荷がかかってしまう可能性が考えられる。また、流量を多くする場合、多くの培養液が必要となるため、低コストでハイスループットな解析が可能であるというマイクロ流体デバイスの利点を潰してしまう。そのため、上流と下流の酸素濃度を肝臓内の酸素濃度の範囲に収める場合は、デバイスの流路長さを短くする、デバイスをより小型化するなどの設計の改善が必要であると考えられる。

しかし、文献値に見られる肝臓内の酸素濃度は主に動脈血と静脈血の平均的な酸素濃度を計測し、細胞が受け取っている酸素濃度を推測しているものである。血流により運ばれてくる酸素を考慮すると、実際に細胞が晒されている酸素濃度は文献値よりも高い可能性がある。また、デバイス内においては細胞が培養液の流れに晒されているが、*in vivo* では流れに晒されていないため、細胞の酸素への接触方法や酸素の受け取り方が同様とは限らない。以上から、デバイス内と *in vivo* を比較して議論することは容易ではないことが考えられる。また、第 4 章のキャリブレーションにおいて 1.5 ppm 以下の輝度が測定できていないが、本研究において測定が行われた酸素濃度の範囲は 0~8 ppm の中でも全体にわたっているため、本研究で行った実験に関する誤差は大きくないと考えられる。

RT-qPCR 用デバイスシステムでは、評価のために細胞を回収するため、HepG2 のような継代が可能な細胞のみにしか使用できない。そのため、第 5, 6 章での Rat 初代培養肝細胞を用いた実験では、細胞を回収しない免疫染色用デバイスシステムのみを用いて実験をしている。本研究で開発した RT-qPCR 用デバイスシステムを Rat 初代培養肝細胞のような継代・剥離が不可能な細胞に適用する場合は、Trypsin の代わりに Trizol などの細胞を溶解させる溶液を流し、局所的に細胞を回収するのではなく溶解させる必要があると考えられる。

第 6 章における Phenacetin を用いた薬物実験の結果から、Phenacetin を投与して Rat 初代培養肝細胞を灌流培養した場合、デバイス内低酸素領域において CYP3A2 の発現量が多くなることが示唆された。このことから、本デバイスシステムを用いて Phenacetin のアセトアミノフェンへの代謝を再現できる可能性が示された。また、96 ウェルプレートを用いた実験においては、低酸素条件において細胞の接着や進展が不十分であったが、本デバイスを用いた実験においては、低酸素領域においても細胞が十分に接着・伸展可能であることが示され、細胞活性に左右されずに ROS の発現量の比較が可能であることが示唆された。

本研究では、免疫染色法と RT-qPCR により肝機能の分析を行っているが、どちらも侵襲的な方法のため、急性の肝機能変化と経時性の肝機能変化の双方を見ることが難しいと考えられる。胆汁分泌、糖代謝、細胞増殖、アポトーシスなどの指標であるカルシウムイオンを測定する手法を本研究に組み込むことができれば、リアルタイムでの肝機能変化が測定可能となり、さらに詳細な肝機能の分析が可能になると考えられる [Amaya 2013].

本研究では、可視化されたデバイス内酸素濃度分布と、免疫染色結果を比較して、両者を関連付けることに成功した。また、流入する培養液の酸素濃度を制御することで、特定の酸素濃度の勾配の形成に再現性を持たせることを可能にした。現在、肝臓だけではなく、肺、脳、腎臓の各機能の制御にも酸素濃度勾配が影響していることが考えられている。そのため、本デバイスシステム内で肺、脳、腎臓の細胞を培養することで、それらの臓器に対する薬剤や代謝機能の研究にも応用可能であることが考えられる。



## 7.3 結言

本章では，第4～6章における各実験結果を総括して，本研究で開発したデバイスシステム全体の考察を行った．次章では，本研究のまとめと今後の展望について述べる．



## 第 8 章

### 結論

---

8.1	本研究のまとめ.....	142
8.2	今後の展望.....	145

---

## 8.1 本研究のまとめ

本研究では、肝細胞を灌流培養した際に、肝細胞の酸素消費のみを利用してデバイス内部に酸素濃度勾配を形成すると同時に、酸素センサフィルムによりリアルタイムでデバイス内の酸素濃度を 2 次元的に可視化することによって細胞応答とその細胞の置かれた環境を関連付けて評価することを可能とした肝細胞培養デバイスシステムを開発した。開発したデバイスは *in vivo* における肝細胞周りの酸素濃度勾配の発生の方法を模倣し、物質の流れ方向と酸素濃度が減少する方向を一致させることで酸素濃度勾配のみならず代謝産物の流れをも同時に *in vitro* で再現した。その結果、約 2 日間の灌流培養を行うことで *in vivo* に類似したタンパク質の発現傾向をデバイス内で再現することに成功した。開発したデバイスシステムは免疫染色用と RT-qPCR 用の 2 種類であり、用途に応じてデバイスシステムを使い分けることでより詳細な細胞応答の分析を可能とした。また、どちらのデバイスシステムにおいても流量を制御することで酸素濃度勾配を調節可能であり、一定の再現性を保てるため、肝細胞だけではなく、細胞応答に酸素濃度勾配が関係している肺、脳、腎臓などの細胞に関する検証実験にも応用可能であると示唆される。以上から、本研究は、現在 *in vitro* 試験で課題となっていた、複数の肝機能の発現を *in vitro* で同時に再現することに成功し、かつ、開発したデバイスシステムに関して肝細胞の荷の使用にとどまらない応用性を示し、動物実験の代替となる新しい *in vitro* 試験方法の確立につながる成果を得た。

### 各章のまとめ

第 1 章では、本研究の背景として、新薬開発の過程で動物実験の代替法となりうる *in vitro* 試験方法の開発の重要性を取り上げた。主に現在報告されている *in vitro* 試験方法の問題点として、複数の肝機能を同時にバランスよく再現できないことを指摘し、*in vivo* 肝臓の環境を再現するには、*in vivo* 肝臓における規則的な血管の配置から形成される酸素濃度勾配および代謝産物の輸送方向を考慮する必要があることを説明した。そして、*in vivo* 肝臓の環境を模倣し、*in vivo* での肝細胞の代謝機能を *in vitro* で再現しうる手法を提案するために、細胞培養をしながら酸素濃度勾配を培養空間に形成し、かつ、内部の細胞の環境応答の可視化を可能とする肝細胞培養システムの開発という本研究の目的を述べた。

第 2 章では、まず、マイクロ流体デバイスが生体内環境の模倣に適していることについて、マイクロ流体デバイスによる微小環境制御の例と、その応用として生体内臓器をマイクロ空間に模倣した *Organs on a chip* を紹介しながら述べた、そして、*Organ on a chip* の一種であり薬物代謝に最も大きく関わる肝臓を模倣した *Liver on a chip* と酸素濃度勾配を考慮した肝細胞培養マイクロデバイスについて、*in vivo* 同様に酸素濃度の減少方向と物質の輸送方

向が一致していること、かつ内部の酸素濃度分布をリアルタイムで計測し細胞の代謝情報と関連付けることの両方を同時に可能とする肝細胞培養デバイスシステムの報告が今までにないという問題点を指摘した。また、本研究では細胞を培養するだけでなく、細胞の環境応答を可視化するデバイスシステムの開発を目指すため、細胞の環境応答の評価方法について触れ、システムに搭載可能な方法を検討した。そして、1細胞について位置情報と細胞応答を視覚的に関連付けることのできる免疫染色法と、少ない細胞数から定量的で遺伝子発現レベルの詳細な分析を可能とする RT-qPCR の 2 種類の 방법이無視できないことを述べ、それぞれの評価方法に合わせたものとして、2種類のデバイスシステムを提案し、設計要件を列挙した。

第3章では、酸素濃度勾配を細胞培養部分で形成するために必要な、デバイス内酸素濃度の制御システムおよび計測システムについて述べた。デバイス内酸素濃度の制御システムとして、デバイスに流入する酸素濃度を調整する機構を開発し、開発したシステム内で形成可能な酸素濃度の範囲を特定し、*in vivo* において肝動脈側の酸素濃度を再現可能であることを占めた。また、酸素濃度の計測システムに関して、酸素濃度を測定するためのセンサ例を複数上げ、本デバイスシステムにはシート（フィルム）型蛍光センサが適していることを述べ、蛍光センサフィルムを搭載したデバイスを用いて、蛍光センサフィルムのキャリブレーションを行った。

第4章では、第2章と第3章を踏まえて、zonation を実現するための肝細胞培養システムを設計・開発した。そして、開発した免疫染色用デバイスシステムおよび RT-qPCR 用デバイスシステムの内部で HepG2 を培養し、酸素濃度勾配を細胞培養用流路の内部で形成可能であることを示した。また、流入する培養液の流量をが特定の値である場合、形成される酸素濃度勾配に再現性を持たせることが可能であることと、流量を多くすることで酸素濃度勾配を緩やかにすることが可能であることを示した。また、RT-qPCR 用デバイスにおいては、開発したデバイスシステムを用いて、Trypsin が流れた領域のみにおいて、RT-qPCR に十分な量の細胞を局所的に回収することが可能であることを示した。

第5章では、免疫染色用デバイスシステムを用いて Rat 初代培養肝細胞を酸素濃度勾配下で培養し、酸素濃度の異なる領域でのタンパク質の発現傾向の差を観察した。1日間の灌流培養の後に免疫染色を行った8種類のタンパク質のうち、6種類において *in vivo* と類似した発現傾向が得られた。また、2日間の灌流培養を経た場合は、1日間の灌流培養において低酸素領域と高酸素領域での発現に十分な差が見られなかったタンパク質も *in vivo* と類似した発現傾向をはっきりと示した。

第6章では、本デバイスシステム内で培養した Rat 初代培養肝細胞に薬物 Phenacetin を投与し、高酸素領域と低酸素領域での細胞応答を観察する実験を行った。細胞形状の変化やタンパク質の免疫染色結果から、薬物投与を行っていない第5章の実験結果と比較評価した。

本研究では、デバイス内で HepG2 および Rat 初代培養肝細胞を培養した場合に、細胞培養用流路内部に酸素濃度勾配を形成し、2 次元的な酸素濃度分布を蛍光によって可視化し、可視化した濃度分布を酸素濃度の値に変換することが可能な肝細胞培養デバイスシステムの開発に成功した。工学的な観点では、流入する培養液の酸素濃度を制御することで、特定の酸素濃度の勾配の形成に再現性を持たせることを可能にした。また、シースフローを用いて広い流路内での物質の拡散を防ぐ方法を応用し、広い流路内であっても一部分にだけ細く薬物を流すことができる、局所的に細胞を回収可能なデバイスの開発にも成功した。生物学的な観点では、*in vivo* における肝機能に近い機能を保持する Rat 初代培養肝細胞を本デバイス内で培養することで、可視化されたデバイス内酸素濃度分布と、免疫染色結果を比較して、両者を関連付けることに成功した。また、実際に薬物として Phenacetin を用いた毒性試験を行い、開発したデバイスシステムの毒性試験への実用性を示した。以上のことから、本研究は *in vivo* 肝臓の環境を *in vitro* で再現するシステムおよび製薬における新しい *in vitro* 試験方法につながる成果を示した。

## 8.2 今後の展望

今後の展望として、一番重要であるのが、デバイス内環境をより *in vivo* に近づけていくことである。本研究では、肝小葉の酸素濃度勾配に着目し、細胞培養デバイス内に酸素濃度勾配を形成することに成功した。次の段階として、形成した酸素濃度勾配をできるだけ肝小葉内の酸素濃度の範囲に近づけていくことが必要になると考えられる。肝臓内の酸素濃度はおよそ 0.7~2.2 ppm であり、デバイス長さや形状を工夫することで、デバイスの Inlet 付近を 2.2 ppm, Outlet 付近を 0.7 ppm にすることができれば、より *in vivo* 状態に近い細胞応答を観察可能であると考えられる。他に *in vivo* に近づける必要がある要素として、デバイス底面の形状と細胞に対する培養液の流れの当たり方である。まず、デバイス底面の形状に関して、流路構造に 3次元構造を持たせれば、3次元培養によって、より *in vivo* 条件に近い高密度培養や liver zonation の構造の *in vitro* での再現に繋がる可能性がある。流れの当たり方に関して、本デバイスシステムでは灌流させる培養液の流れを血流に見立てた設計をしているが、本来肝細胞は直接血流に当たっていない。そのため、肝細胞は非常にせん断応力に弱いとされている。半透膜や穴をあけた PDMS などを用いて、酸素、養分および代謝産物が内外で交換可能な疑似血管のような機構を成形し、片側に肝細胞を、もう片側に培養液の流れを作ることによって、せん断応力を減少させることができれば、より細胞への負担が減少すると考えられる。

次に、培養期間の観点から、十分に長期培養ができるデバイスシステムを作ることが重要であると考えられる。本研究結果から、より長く灌流培養を続けた場合のほうが *in vivo* により近いタンパク質の発現傾向が得られているため、1週間~2週間単位で安定して灌流培養が可能な系を設計することができれば、より高酸素領域と低酸素領域で明確な細胞応答の差を確認することが可能になると考えられる。

最後に、他の臓器を模した Organ on a chip と組み合わせたシステムの開発を最終的に視野に入れることが重要であると考えられる。本デバイスを含む Organ on a chip は異なる臓器を模倣した複数のチップを組み合わせることによって様々な生体反応のシステムを構築することが出来る。例えば、本研究で開発した肝細胞培養デバイスを、腎臓を模した Kidney on a chip と組み合わせることにより、毒物が肝臓によって解毒されてから腎臓でろ過されて体外に排出される様子を、胃腸を模したチップと組み合わせることによって、腸で吸収された糖分が肝臓でグリコーゲンに変えられ蓄積される様子を *in vitro* で再現できると考えられる。このように複数のチップと組み合わせることで、肝細胞の代謝機能や肝臓内の細胞間の相互作用のみならず、*in vivo* における臓器間の相互作用の解明にも貢献が可能となる。

上記の要件を解決することができれば、デバイス内での肝代謝の再現を可能にし、新薬開

発の非臨床試験において動物実験の代替法となる *in vitro* 試験方法の実現に繋がることが期待される。



---

# 謝辞

本論文を締めくくるにあたり、御指導、御協力をいただき、お世話になったすべての方々に対し、深く感謝の意を表します。

本研究の指導教員である東京大学生産技術研究所教授 藤井輝夫先生には、Organ on a chip に関わる非常に興味深い分野の研究を任せていただき、博士課程以前から終始ご指導ご鞭撻いただきました。領域横断的な分野を研究する上で重要な着眼点から、研究全般に対する取り組み方まで、研究者として歩を進めていくうえで数多くの大切なことを学ばせていただきました。また、ご多忙であるにもかかわらず個別にディスカッションの時間を設けてくださるなど、締め切り間近まで実験をしていた自分を最後まであたたかく支援して下さったこと、深く感謝しております。心よりお礼申し上げます。

東京大学大学院工学系研究科精密工学専攻教授 神保泰彦先生には、本研究の副査を務めていただき、主に博論全体のまとめ方や考察方法に的確な助言をいただきました。特に、生物分野を含む本研究において疎かになりがちな機械工学的分野の観点や精密性の議論に関して、数々のフォローアップをいただきましたこと、深く感謝しております。心よりお礼申し上げます。

東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻教授 酒井康行先生には、本研究の副査を務めていただき、主に肝細胞の性質や培養方法など、生物学的観点からのご助言を多くいただきました。先生から肝細胞に関する専門知識を吸収できたことで、本研究における実験方法・解析方法及び考察が大いに捗ったことは確実です。また、本郷駒場両方に研究室を持ちお忙しいにもかかわらず、直前まで気軽にディスカッションにご対応くださったこと、深く感謝しております。心よりお礼申し上げます。

東京大学生産技術研究所教授 Beomjoon Kim 先生には、本研究の副査を務めていただくだけでなく、博士過程以前から同テーマに関して深く終始ご指導ご鞭撻いただきました。

マイクロデバイスの生体応用に関する専門家としての鋭い視点からのご助言を数多くいただき、**Organ on a chip** の研究において必要とされる生物学的観点と機械工学的観点の両方をバランスよくを学ばせていただきましたこと、深く感謝しております。心よりお礼申し上げます。

東京大学生産技術研究所准教授 松永行子先生には、本研究の副査を務めていただき、主に生物学的視点からの確かな助言をいただきました。デバイス内細胞培養を行う上での適切な着眼点や、細胞機能の評価方法の詳細に関して数多くのフォローアップをいただきましたこと、深く感謝しております。また、藤井研究室との交流の場において積極的にお話させていただいて、研究生活の支えとなっていただきましたこと、心よりお礼申し上げます。

LIMMS/CNRS-IIS Senior Researcher Eric Leclerc 先生には、**Organ on a chip** の中でも **Liver on a chip** や肝臓に関する基礎的知識をくまなくご教授いただき、一番身近な形で本研究に関わっていただきました。Eric 先生のような専門家のサポートに助けられたからこそ、背景知識の習得やデバイス設計などを極めてスムーズに行うことが出来たと感じます。筆者の拙い英語と向き合い、ほぼ毎週ディスカッションの時間を設けていただいたこと、非常に感謝しております。

東京大学生産技術研究所教授 酒井康行先生、助教 小森喜久夫先生、特任助教 篠原満利恵先生には、本研究について共同研究という形で多くの肝細胞に関する研究についてご教授いただきました。酸素濃度の計測方法や、分子拡散に関する考え方、酸素感受性蛍光材料の濃度設定など、化学的側面に関する考え方をご指導いただき、本研究の要となる部分での確なご助言をいただきました。また、締め切り直前まで酸素濃度計などの酒井研究室の機材を快く使わせていただいたり、こちらの予定を鑑みて **Rat** 初代培養肝細胞を採取するための動物実験を頻繁に行ってくださいましたこと、誠に感謝しております。

東京大学生産技術研究所特任助教 木下晴之先生には、主に本研究の工学的側面において多くご指導ご鞭撻をいただきました。製図ソフトや解析ソフトの使い方から、要求を満たすデバイスの製作方法に関する重要なポイントまで、ソフトとハードの両者について基礎から懇意に教えていただき、休日や年末年始においてもサポートに回っていただけたこと心より感謝しております。厚くお礼申し上げます。

東京大学生産技術研究所特任研究員 前川敏郎氏には、主に本研究の生物学的側面において多くご指導ご鞭撻をいただきました。本研究で一番難しい細胞を扱う面においての様々な

---

テクニックをご教授いただき、難点にぶつかった際に親身に相談に乗っていただいた際は、毎回の確なアドバイスをいただくことができました。同時に、研究面でなく研究室での生活面や研究者としての進路などに関する相談にも乗っていただき、精神的に救われた部分が非常に大きかったです。心より感謝申し上げます。

東京大学生産技術研究所助教 Soo Hyeon Kim 先生，博士研究員 土肥浩太郎氏，近森正智氏には，研究会やディスカッションにおいて的確で具体的な御助言を頂きましたと同時に，発表構成の論理展開についても熱心にご指導いただきました。似ている研究テーマを扱われている御三方からは，より効率的で実践的なデバイス作製手法をご教授いただく事ができ，本研究を進める上で非常に参考になりました。ここに感謝の意を表します。

藤井研究室秘書の岩本慶子さん，山田全代さんには，研究に関する事務手続きから日常生活の他愛ない雑談まで大変お世話になりました。非常に親切にいただき，また，女性同士ということもあって非常に心落ち着く時間を過ごすことができました。書類の切や各ミーティングのスケジュール管理などの事務作業から，研究生活に関する相談に関してまで，毎回ご迷惑をお掛けするばかりの筆者をいつでも優しく迎えてくださって，申し訳なさ感謝で一杯です。本当にありがとうございました。

東京大学生産技術研究所技術専門員 田子沙織さん，吉田后那さんには研究生活において大変お世話になりました。学生の少ない本研究室で年齢の近い御二方と昼食をご一緒しながら研究の話や雑談をするのが大好きでした。精神的に大きく支えていただいていたと感じます，心よりお礼申し上げます。

他にも，様々な形で支えとなってくださった本研究室の皆様や卒業していかれた先輩方，酒井研究室の皆様，精密工学科の先輩方，同輩，後輩の皆様のご協力あって研究をこのような形で修めることができていると感じます，本当にありがとうございました。

最後になりましたが，卒論，修論時に増して研究室に泊まり込み続ける筆者を時に励まし時に叱り，何より博士進学に理解を持って3年間応援してくださり，そしていつもあたたかく支え続けてくれた家族に心から感謝いたします。

平成 31 年 1 月 松本倫実



## 参考文献

<和文文献>

[泉井 2002]

泉井亮: カラー図解 人体の正常構造と機能 IV 肝・胆・膵, 日本医事新報社, 2002.

[亀有 2012]

亀有知宏, 松田侑, 江上泰広, 山口浩樹, 新美智秀: “白金ポルフィリン (PtTFPP) と CdSe/ZnS を用いた圧力/温度複合センサの開発”, Mechanical Engineering Congress, Japan, J053011, 2012.

[合田 2013]

合田亘人: “HIF による肝臓内糖・脂質代謝制御機構”, 生化学, Vol.84, pp.942-947, 1983.

[佐能 2015]

佐能正剛: “ヒトにおける医薬品の肝毒性及び代謝物の *in vitro*, *in vivo* 予測評価系の構築に関する研究”, 薬学雑誌, Vol.135, pp.1273-1279, 2015.

[妹尾 1983]

妹尾学, 山岡正和: “シリコン液膜を通しての酸素輸送”, 生産研究, Vol.35, pp.277-280, 1983.

[高木 2007]

高木睦: セルプロセッシング工学, コロナ社, 2007.

[玉井 2011]

玉井郁巳: “細胞内オルガネラ膜輸送体の評価系樹立による薬物の細胞内動態と細胞毒性発現機構の解析”, 上原記念生命科学財団研究報告集, Vol.25, 61, 2007.

[八木 2010]

八木崇, 大久保昌美: “医薬品開発の期間と費用”, JPMA News Letter, Vol.136, pp.33-35, 2010.

---

<英文文献>

[Allen 2003]

J. W. Allen, S. N. Bhatia: “Formation of steady-state oxygen gradients *in vitro*: application to liver zonation,” *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.82, pp.253-262, 2003.

[Allen 2005]

J. W. Allen, S. R. Khetani, S. N. Bhatia: “*In vitro* zonation and toxicity in a hepatocyte bioreactor,” *Toxicological Sciences*, Vol.84, pp.110-119, 2005.

[Amaya 2013]

M. J. Amaya, M. H. Nathanson: “Calcium Signaling in the Liver,” *Comprehensive Physiology*, Vol.3, pp.515-539, 2013.

[Baudoin 2007]

R. Baudoin, L. Griscom, M. Monge, C. Legallais, E. Leclerc: “Development of a renal microchip for *in vitro* distal tubule models,” *Biotechnology Progress*, Vol.23, pp.1245-1253, 2007.

[Baudoin 2014]

R. Baudoin, G. Alberto, A. Legendre, P. Paullier, M. Naudot, M. J. Fleury: “Investigation of expression and activity levels of primary rat hepatocyte detoxication genes under various flow rates and cell densities in microfluidic biochips,” *Biotechnology Progress*, Vol.30, pp.401-410, 2014.

[Berry 1997]

M.N. Berry, A.R. Grivell, M.B. Grivell, J.W. Phillips: “Isolated hepatocytes — past, present and future,” *Cell Biology and Technology*, Vol.13, pp.223-233, 1997.

[Bhatia 1997]

S. N. Bhatia, M. L. Yarmush, M. Toner: “Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts,” *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.34, pp.189-199, 1997.

[Bhatia 1999]

S. N. Bhatia, U. J. Balis, M. L. Yarmush, M. Toner: "Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells," *The FASEB Journal*, Vol.13, pp.1883-1900, 1999.

[Behnia 2000]

K. Behnia, S. Bhatia, N. Jastromb, U. Balis, S. Sullivan, M. Yarmush, M. Toner: "Xenobiotic metabolism by cultured primary porcine hepatocytes," *Tissue Engineering*, Vol.6, pp.467-479, 2000.

[Berthiaume 1996]

F. Berthiaume, P. V. Moghe, M. Toner, M. Yarmush: "Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in sandwich configuration," *The FASEB Journal*, Vol.10, pp.1471-1484, 1996.

[Boess 2003]

F. Boess, M. Kamber, S. Romer, R. Gasser, D. Muller, S. Albertini, L. Suter: "Gene expression in two hepatic cell lines, cultured primary hepatocytes, and liver slices compared to the in vivo liver gene expression in rats: possible implications for toxicogenomics use of in vitro systems," *Toxicological Sciences*, Vol.73, pp.386-402, 2003.

[Brennan 2014]

M. D. Brennan, M. L. Rexius-Hall, L. J. Elgass, D. T. Eddington: "Oxygen control with microfluidics," *Lab on a Chip*, Vol.14, pp.4305-4307, 2014.

[Chan 2002]

M. A. Chan, S. K. Lam, D. Lo: "Characterization of erythrosin B-doped sol-gel materials for oxygen sensing in aqueous solutions," *Journal of Fluorescence*, Vol.12, pp.327-332, 2002.

[Chen 2011]



---

Y. A. Chen, A. D. King, H. C. Snih, C. C. Peng, C. Y. Wu, W. H. Liao, Y. C. Tung: “Generation of oxygen gradients in microfluidic devices for cell culture using spatially confined chemical reactions” *Lab on a Chip*, Vol.11, pp.3626-33633, 2011.

[Choi 2004]

S. H. Choi, M. Nishikawa, A. Sakoda, Y. Sakai: “Feasibility of a simple double-layered coculture system incorporating metabolic processes of the intestine and liver tissue: application to the analysis of benzo[a]pyrene toxicity,” *Toxicology in vitro*, Vol.18, pp.393-402, 2004.

[Clark 1953]

J. Clark, C. Leland, R. Wolf, D. Granger, Z. Taylor : “Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography,” *Journal of Applied Physiology*, Vol.6, pp.189-193, 1953.

[Cui 2015]

S. Cui, Z. He, Z. Zhu, Z. Sun, Y. Xu, J. Wang, Y. Bao, D. Ji, S. Liu, J. Liu, J. Zhang, Q. Wang: “Microfluidic analysis of PM2.5-induced epithelial-mesenchymal transition in human bronchial epithelial 16HBE cells” *Microfluidics and Nanofluidics*, Vol.19, pp.263-272, 2015.

[Davidson 2012]

A. J. Davidson, M. J. Ellis, J. B. Chaudhuri: “A theoretical approach to zonation in a bioartificial liver,” *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.109, pp.234-243, 2012.

[Dmitriev 2012]

R. I. Dmitriev, A. V. Zhdanov, G. Jasionek, D. B. Papkovsky: “Assessment of cellular oxygen gradients with a panel of phosphorescent oxygen-sensitive probes,” *Analytical Chemistry*, Vol.84, pp.2930-2938, 2012.

[Foy 1994]

B. D. Foy, A. Rotem, M. Toner, R. G. Tompkins, M. L. Yarmash: “A device to measure the oxygen uptake rate of attached cells: importance in bioartificial organdesign,” *Cell Transplantation*, Vol.6, pp.515-527, 1994.

[Frank 2013]

T. Frank, S. Tay: “Flow-switching allows independently programmable, extremely stable, high-throughput diffusion-based gradients,” *Lab on a Chip*, Vol.13, pp.1273-1281, 2013.

[Frisk 2007]

T. Frisk, S. Rydholm, T. Liebmann, H. A. Svahn, G. Stemme, H. Brismar: “A microfluidic device for parallel 3-D cell cultures in asymmetric environments,” *Electrophotonics*, Vol.10, pp.4705-4712, 2007.

[Fukuba 2009]

T. Fukuba, C. Provin, K. Okamura, T. Fujii: “Development and evaluation of microfluidic device for Mn ion quantification in ocean environments,” *IEEE Transactions on Semiconductor Manufacturing*, Vol.129, pp.69-72, 2009.

[Funamoto 2012]

K. Funamoto, I. K. Zervantonakis, Y. Liu, C. J. Ochs, C. Kim, R. D. Kamm: “A novel microfluidic platform for high-resolution imaging of a three-dimensional cell culture under a controlled hypoxic environment,” *Lab on a Chip*, Vol.12, pp.4855-4863, 2012.

[Garcia-Cordero 2010]

J. L. Garcia-Cordero, L. M. Barrett, R. O’Kennedy, A. J. Ricco: “Microfluidic sedimentation cytometer for milk quality and bovine mastitis monitoring,” *Biomedical Microdevices*, Vol.12, pp.1051-1059, 2010.

[Gillanders 2004]

R. N. Gillanders, M. C. Tedford, P. J. Crilly, R. T. Bailey: “A composite sol-gel/fluoropolymer matrix for dissolved oxygen optical sensing,” *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol.163, pp.193-199, 2004.

[Goulet 1998]

F. Goulet, C. Normand, O. Morin: “Cellular interactions promote tissue-specific function, biomatrix deposition and junctional communication of primary cultured hepatocytes,” *Hep-*

---

*atology*, Vol.8, pp.1010-1018, 1998.

[Hackam 2006]

D. G. Hackam, D. A. Redekmeier: "Translation of research evidence from animals to humans," *The JAMA network*, Vol.296, pp.1731-1732, 2006.

[Huber 1991]

B. E. Huber, C. A. Richards, T. A. Krenitsky: "Retrieval-medical gene-therapy for the treatment of hepatocellular-carcinoma - an innovative approach for cancer therapy," *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, Vol.88, pp.8039-8043, 1991.

[Huh 2010]

D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. M. Zavala, H. Y. Hsin, D. E. : "Reconstituting organ-level lungfunctions on a chip," *Science*, Vol.328, pp.1662-1668, 2010.

[Huh 2012]

D. Huh, Y. Torisawa, G. A. Hamilton, H. J. Kim, D. E. Ingber: "Microengineered physiological biomimicry: organs-on-chips," *Lab on a Chip*, Vol.12, pp.2156-2164, 2012.

[Jang 2010]

K. J. Jang, K. Y. Suh: "A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells," *Lab on a Chip*, Vol.10, pp.36-42, 2010.

[Jungermann 1996]

K. Jungermann, T. Kietzmann: "Oxygen: modulator of metabolic zonation and disease of the liver," *Annual review of Nutrition*, Vol.16, pp.179-203, 1996.

[Jungermann 2000]

K. Jungermann, T. Kietzmann: "Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver," *Hepatology*, Vol.31, pp.255-260, 2003.

[Karihara 2000]

S. Karihara, S. Kim, B. S. Kim, D. J. Mooney, K. Tanaka, J. P. Vacanti: “Survival and function of rat hepatocytes cocultured with nonparenchymal cells or sinusoidal endothelial cells on biodegradable polymers under flow conditions,” *Journal of Pediatric Surgery*, Vol.35, pp.1287-1290, 2000.

[Kieninger 2018]

J. Kieninger, A. Weltin, H. Flamm, G. A. Urban: “Microsensor systems for cell metabolism - from 2D culture to organ-on-chip,” *Lab on a Chip*, Vol.18, pp.1274-1291, 2018.

[Kim 2013]

M. Kim, R. H. W. Lam, T. Thorsen, H. H. Asada: “Mathematical analysis of oxygen transfer through polydimethylsiloxane membrane between double layers of cell culture channel and gas chamber in microfluidic oxygenator,” *Microfluid Nanofluid*, Vol.15, pp.285-296, 2013.

[Kimura 2008]

H. Kimura, T. Yamamoto, H. Sakai, Y. Sakai, T. Fujii: “An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of intestinal tissue models,” *Lab on a Chip*, Vol.8, pp.741-746, 2008.

[Komori 2012]

K. Komori, S. Fujii, K. Montagne, H. Nakamura, H. Kimura, K. Otake, T. Fujii, Y. Sakai: “Development of a well-of-the-well system-based embryo culture plate with an oxygen sensing photoluminescent probe,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol.162, pp.278-283, 2012.

[Kraus 2006]

T. Kraus, E. Verpoorte, V. Linder, W. Franks, A. Hierlemann, F. Heer, A. Hafizovic, T. Fujii, N. F. de Rooij, S. Koster: “Characterization of a microfluidic dispensing system for localised stimulation of cellular networks,” *Lab on a Chip*, Vol.6, pp.218-229, 2006.

[Landry 1985]

J. Laundry, D. Bernier, C. Ouellet, R. Goyette, N. Marceau: “Spheroidal aggregate culture of rat liver cells: histotypic reorganization, biomatrix deposition, and maintenance of functional

---

activities,” *the Journal of Cell Biology*, Vol.101, pp.914-923, 1985.

[Lerche-Langrand 2000]

C. Lerche-Langrand, H. J. Toutain: “Precision-cut liver slices: characteristics and use for *in vitro* pharmaco-toxicology,” *Toxicology*, Vol.153, pp.221-253, 2000.

[Leclerc 2003]

E. Leclerc, Y. Sakai, T. Fujii: “Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS,” *Biomedical Microdevices*, Vol.5, pp.109-114, 2003.

[Lee 2007]

P. J. Lee, P. J. Hung, L. P. Lee: “An artificial liver sinusoid with a microfluidic endothelial-like barrier for primary hepatocyte culture,” *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.97, pp.1340-1346, 2007.

[Liu 2016]

T. Liu, A. X. Chen, A. Dodge, G. F. Fernandez, J. A. Miranda, A. Chhabra, M. Bigdeli Karimi, S. N. Bhatia, R. J. Lang, C. Livermore: “Origami-enabled artificial liver tissue,” *The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2016)*, pp.5-6, 2016.

[Mac 2014]

I. W. Y. Mac, N. Evaneiw, M. Ghert: “Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment,” *American Journal of Translational Research*, Vol.6, pp.114-118, 2014.

[Machide 2006]

M. Machide, A. Hashigasako, K. Matsumoto, T. Nakamura: “Contact inhibition of hepatocyte growth regulated by functional association of the c-Met/hepatocyte growth factor receptor and LAR protein-tyrosine phosphatase,” *Journal of Biological Chemistry*, Vol.281, pp.8765-8772, 2006.

[Malda 2004]

J. Malda, J. Rouwkema, D. E. Martens, E. P. le Comte, F. K. Kooy, J. Tramper, C. A. van Blitterswijk, J. Riesle: "Oxygen gradients in tissue-engineered PEGT/PBT cartilaginous constructs: measurement and modeling," *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.86, pp.9-18, 2004.

[Matsuura 2010]

Y. Matsuura, H. Yagi, S. Matsuda, O. Itano, K. Aiura, S. Kuroda, M. Ueda, Y. Kitagawa: "Human liver-specific nanocarrier in a novel mouse xenograft model bearing noncancerous human liver tissue," *European Surgical Research*, Vol.46, pp.65-72, 2010.

[Mauleon 2012]

G. Mauleon, C. P. Fall, D. T. Eddington: "Precise spatial and temporal control of oxygen within *in vitro* brain slices via microfluidic gas channels," *Plos One*, Vol.7, Issue 8, e43309, 1-9, 2010.

[McCarty 2016]

W. J. McCarty, O. B. Usta, M. L. Yarmush: "A microfabricated platform for generating physiologically-relevant hepatocyte zonation," *Scientific Reports*, 6:26868, 2016.

[Mehling 2014]

M. Mehling, S. Tay: "Microfluidic cell culture," *Current Opinion in Biotechnology*, Vol.25, pp.95-102, 2014.

[Mehta 2007]

G. Mehta, K. Mehta, D. Sud, J. W. Song, T. B. Begey, N. Futai, Y. S. Heo, M. A. Mycek, J. J. Linderman, S. Takayama: "Quantitative measurement and control of oxygen levels in microfluidic poly(dimethylsiloxane) bioreactors during cell culture," *Biomedical Microdevices*, Vol.9, pp.123-134, 2007.

[Monga 2011]

S. P. S. Monga: *Molecular pathology of liver diseases*, Springer, pp.7-16, 2011.

[Montagne 2009]

K. Montagne, K. Komori, F. Yang, T. Tatsuma, T. Fujii, Y. Sakai: "A micropatterned cell array

---

with an integrated oxygen-sensitive fluorescent membrane,” *Photochemical and Photobiological Sciences*, Vol.8, pp.1529-1533, 2009.

[Nahmias 2007]

Y. Nahmias, F. Berthiaume, M. L. Yarmush: “Integration of technologies for hepatic tissue engineering,” *Tissue Engineering II Basics of Tissue Engineering and Tissue Applications*, Vol.103, pp.309-329, 2007.

[Nakao 2011]

Y. Nakao, H. Kimura, Y. Sakai, T. Fujii: “Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocytes in a microfluidic device,” *Biomicrofluidics*, Vol.5, 022212, 2011.

[No 2015]

D. Y. No, K. H. Lee, J. Lee, S. H. Lee: “3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip,” *Lab on a Chip*, Vol.15, pp.3822-3837, 2015.

[Oomen 2016]

P. E. Oomen, M. D. Skolimowski, E. Verpoorte: “Implementing oxygen control in chip-based cell and tissue culture systems,” *Lab on a Chip*, Vol.16, pp.3394-3414, 2016.

[Powell 1989]

G. M. Powell, H. M. Hughes, C. G. Curtis: “Isolated perfused liver technology for studying metabolic and toxicological problems,” *Drug Metabolism and Drug Interactions*, Vol.7, pp.53-86, 1989.

[Prot 2012]

L. M. Prot, A. Bunescu, B. E. Herrmann, C. Aninat, L. C. Snouber, L. Griscom, F. Razan, F. Y. Bois, C. Legallais, C. Brochot, A. Corlu, M. E. Dumas, E. Leclerc: “Predictive toxicology using systemic biology and liver microfluidic “on chip” approaches: Application to acetaminophen injury,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol.259, pp.270-280, 2012.

[Sato 1999]

H. Sato, M. Funahashi, D. B. Kristensen, C. Tateno, K. Yoshizato: “Pleiotrophin as a Swiss 3T3 cell-derived potent mitogen for adult rat hepatocytes,” *Experimental Cell Research*, Vol.246, pp.152-164, 1999.

[Sato 2014]

A. Sato, K. Kadokura, H. Uchida, K. Tsukada: “An *in vitro* hepatic zonation model with a continuous oxygen gradient in a microdevice,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.453, pp.767-771, 2014.

[Sakai 2011]

Y. Sakai, M. Nishikawa, F. Evenou, M. Hamon, H. Huang, K. P. Montagne, N. Kojima, T. Fujii, T. Niino : “Engineering of implantable liver tissues,” *Liver Stem Cells*, Human a Press, pp.189-216, 2011.

[Schneider 2012]

C. A. Schneider, W. S. Rasband, K. W. Eliceiri: “NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis,” *Nature Methods*, Vol.9, pp.671-675, 2012.

[Sena 2010]

E. S. Sena, H. Bart van der Worp, P. M. W. Bath, D. W. Howells, M. R. Macleod: “Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy,” *Plos Biology*, Vol.8, e1000344, 2010.

[Seglen 1976]

P. O. Seglen: “Preparation of isolated rat liver cells,” *Methods in Cell Biology*, Vol.13, 29-83, 1976.

[Sivaraman 2005]

A. Sivaraman, J. K. Leach, S. Townsend, T. Iida, B. J. Hogan, D. B. Stolz, R. Fry, L. D. Samson, S. R. Tannenbaum, L. G. Griffith: “A microscale *in vitro* physiological model of the liver: predictive screens for drug metabolism and enzyme induction,” *Current Drug Metabolism*,



---

Vol.6, pp.1-23, 2005.

[Skolimowski 2010]

M. Skolimowski, M. W. Nielsen, J. Emneus, S. Molin, R. Taboryski, C. Sternberg, M. Dufva, O. Geschke: "Microfluidic dissolved oxygen gradient generator biochip as a useful tool in bacterial biofilm studies," *Lab on a Chip*, Vol.10, pp.2162-2169, 2010.

[Talamini 1997]

M. A. Talamani, B. Kappus, A. Hubbard: "Repolarization of hepatocytes in culture," *Hepatology*, Vol.25, pp.167-172, 1997.

[Tanaka 2006]

Y. Tanaka, M. Yamamoto, T. Okano, T. Kitamori, K. Sato: "Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system," *Measurement Science & Technology*, Vol.17, pp.3167-3170, 2006.

[Tornell 2002]

J. Tornell, M. Snaith: "Transgenic systems in drug discovery: from target identification to humanized mice," *Drug Discovery Today*, Vol.7, pp.461-470, 2002.

[Torre 2011]

C. Torre, C. Perret, S. Colnot: "Transcription dynamics in a physiological process:  $\beta$ -catenin signaling directs liver metabolic zonation," *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol.43, pp.271-278, 2011.

[Underhill 2018]

G. H. Underhill, S. R. Khetani: "Bioengineered liver models for drug testing and cell differentiation studies," *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, Vol.5, No.3, pp.426-439, 2018.

[Villa-Diaz 2009]

A. G. Villa-Diaz, Y. Torisawa, T. Uchida, J. Ding, N. C. Nogueira-de-Souza, K. S. O'Shea, S.

Takayama, G. D. Smith: “Microfluidic culture of single human embryonic stem cell colonies,” *Lab on a Chip*, Vol.9, pp.1749-1755, 2009.

[Whitesides 2001]

G. M. Whitesides, A. D. Stroock: “Flexible methods for microfluidics,” *Physics Today*, Vol.54, pp.42-48, 2001.

[Xiao 2014]

W. Xiao, M. Shinohara, K. Komori, Y. Sakai, H. Matsui, T. Osada: “The importance of physiological oxygen concentrations in the sandwich cultures of rat hepatocytes on gas-permeable membranes,” *Biotechnology Progress*, Vol.30, pp.1401-1409, 2014.

[Xie 2014]

Y. Xie, M. R. McGill, K. Dorko, S. C. Kumer, T. M. Schmitt, J. Forster, H. Jaeschke: “Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes,” *Toxicology and Applied Pharmacology*, Vol.279, pp.266-274, 2014.

[Yu 2001]

L. J. Yu, J. Matias, D. A. Scudiero, K. M. Hite, A. Monks, E. A. Sausville, D. J. Waxman: “P450enzyme expression patterns in the NCI human tumor cell line panel,” *Drug Metabolism and Disposition*, Vol.29, pp.304-312, 2001.

[Zhang 2008]

M. Y. Zhang, P. J. Lee, P. J. Hung, T. Johnson, L. P. Lee, M. R. Mofrad: “Microfluidic environment for high density hepatocyte culture,” *Biomedical and Microdevices*, Vol.10, pp.117-121, 2008.

# 研究業績

## 本論文に関連する内容

### 学術論文

- [1] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Toshiro Maekawa, Haruyuki Kinoshita, Marie Shinohara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Integration of an Oxygen Sensor into a Polydimethylsiloxane Hepatic Culture Device for Two-dimensional Gradient Characterization,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 273, pp.1062-1069, 2018.

### 国際会議

- [1] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Oxygen Gradient Formation in a Microfluidic Cell Culture Device,” 9th Nano and Micro Systems International School, No. 31, Montreal, Canada, 2015.
- [2] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Toshiro Maekawa, Haruyuki Kinoshita, Marie Shinohara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Creation and Visualization of Oxygen Concentration in a Microfluidic Hepatocytes Culture Device,” 8th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2016) ,O2c1, Hong Kong, China, 2016.
- [3] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Toshiro Maekawa, Haruyuki Kinoshita, Marie Shinohara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Visualization of Oxygen Gradient in a PDMS Hepatocyte Culture Device,” The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016) , M037b, Dublin, Ireland, 2016.
- [4] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Toshiro Maekawa, Haruyuki Kinoshita, Marie Shinohara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Position-selective Cell Sampling Using Localized Trypsin Streams,” 9th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2017) ,Tasmania, Australia, 2017.
- [5] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Toshiro Maekawa, Haruyuki Kinoshita, Marie Shinohara,

---

hara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Position-selective Cell Sampling Microfluidic System Using Localized Laminar Flows,” The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) , W145f, Savannah, USA, 2017.

[6] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Toshiro Maekawa, Haruyuki Kinoshita, Marie Shinohara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Visualization of the Difference of Rat Hepatocellular Function under Oxygen Gradient,” 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2018) ,Busan, Korea, 2018.

[7] **Satomi Matsumoto**, Eric Leclerc, Astia Rizki Safitri, Mathieu Danoy, Toshiro Maekawa, Haruyuki Kinoshita, Marie Shinohara, Kikuo Komori, Yasuyuki Sakai and Teruo Fujii: “Recapitulation of Rat Hepatocellular Function Forming Oxygen Gradient in a Microfluidic Cell Culture Device,” The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018) , Kaohsiung, Taiwan, 2018 (発表予定) .

## 国内会議

[1] 松本倫実, 前川敏郎, Eric Leclerc, 酒井康行, 藤井輝夫: “肝細胞培養マイクロデバイスにおける酸素濃度勾配の形成”, 第 16 回公益社団法人計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 1I1-8, 名古屋, 2015.

[2] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “肝細胞培養マイクロデバイス内における酸素濃度可視化手法の基礎的検証”, 2016 年度精密工学会春季大会, E02, 東京, 2016.

[3] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “肝細胞培養マイクロ流体デバイス内に形成された酸素濃度分布の可視化”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 33 回研究会, 1P33, 東京, 2016.

[4] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “肝細胞培養マイクロ流体デバイス内での酸素濃度勾配の形成と可視化”, 2016 年度生物工学若手研究者の集い夏のセミナー, P-64, 東京, 2016.

- [5] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “ガス透過性を低下させたマイクロ流体デバイス内での肝細胞培養条件の決定”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 34 回研究会, 3P09, 東京, 2016.
- [6] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “肝細胞培養デバイスにおけるトリプシンを用いた局所的細胞回収方法の検討”, 2017 年度精密工学会春季大会, E20, 横浜, 2017.
- [7] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “肝細胞培養デバイスにおける層流を用いた局所的細胞回収機構に関する基礎的検証”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 35 回研究会, 3P24, 東京, 2017.
- [8] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “肝細胞培養デバイス内部における細胞機能の評価”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 36 回研究会, 1P16, 桐生, 2017.
- [9] 松本倫実, Eric Leclerc, 前川敏郎, 木下晴之, 篠原満利恵, 小森喜久夫, 酒井康行, 藤井輝夫: “*In vitro* における肝機能変化の酸素濃度依存性に関する検証”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 37 回研究会, 3P35, つくば, 2018.