

## 論文の内容の要旨

論文題目 上皮細胞の二方向観察可能な多孔膜を有するガラスチップ

氏 名 酒井 香苗

### 1. 序論

本研究の目的は、上皮細胞層を垂直方向と水平方向の二方向から形態観察し、物質透過の指標である透過性評価をサンプリング無しに実施できるデバイスを実現することである。本研究で提案するデバイスは、二つの四角形型ガラス流路（ガラスチャネル）で多孔膜を挟む構造を有している（以下、ガラスチップ）。本研究では、まず多孔膜上で上皮細胞を培養できるガラスチップを作製する。次に形成された上皮細胞層を垂直方向と水平方向の双方向から観察可能であることを示す。さらに作製したガラスチップを用いて、上皮細胞層の物質透過評価が行えることを示す。

上皮細胞層の構造異常とバリア機能の低下はガンや感染症といった種々の疾患原因となることが知られており、上皮細胞の形態観察とバリア機能の指標である透過性の評価は疾患のメカニズム解明の観点から研究が行われている。この上皮細胞層の構造異常とバリア機能の評価は、形態観察とその物質透過性を算出することで実現されている。従来の解析ツールとしてはトランズウェルが使用されてきた。トランズウェルは、ポリカーボネートやポリエチレンテレフタレートといった材料でつくられた多孔膜を底面部に有するセルカルチャーインサートとそれを挿入するウェルプレートから成る。上皮細胞をセルカルチャーインサート内に播種して培養し、上皮細胞層を形成させたのち、形態観察と物質透過性評価を行う。しかしながら、形態観察を行う際、細胞の水平方向（細胞の  $xy$  平面）だけしか直接観察することができず、細胞の垂直方向（細胞の  $xz$  平面）の情報を得るためには、細胞の  $xy$  平面の画像を多数枚取得し、それを積層させて三次元情報を構築する必要がある。

この手法で得られた細胞の  $xz$  平面画像の解像度は  $xy$  平面と比較した場合低下しており、取得に時間も要するため時間分解能は低い。さらに、トランズウェルを用いた物質透過評価（透過率法）では、上皮細胞層側（頂端膜側；apical 側）に添加した蛍光トレーサー分子が多孔膜と上皮細胞層を透過してウェルプレート（基底膜側；basal 側）へどれだけ移動したかを濃度算出して評価するため、サンプリングを必要とする。そこで本研究では、上皮細胞層を水平方向と垂直方向の双方向から観察することが可能であり、リアルタイムに蛍光トレーサー分子を可視化できることによりサンプリング無しで透過性評価可能なデバイスを実現することを目的とする。

## 2. 多孔膜を有するガラスチップの作製

第2章では、ガラスチップの作製検討について述べた。組み立て可能な材料の選定を行い、作製方法の検討結果を示し、多孔膜を挿入したガラスチップの作製方法についてまとめた。本研究では作製方法として、接着剤を使用する手法を用いた。ガラスの接着に優れた UV 硬化光学素子用接着剤を使用し、ダイシングソーを用いて切断面が平坦であるガラスチャネルを作製し、2つのガラスチャネルで多孔膜を挟み込むことにより、常温常圧下で多孔膜の化学修飾無しに、デバイス内へ導入することが可能となった。これらガラスチャネルの流路の出入り口は UV 硬化光学素子用接着剤でテフロンチューブを装着し、液体の導入が可能となっており、液体の導入の際に流速を一定に保ちたい場合には、シリコンチューブを取り付けることで、シリンジポンプに接続可能である。本検討での作製手順は以下である。はじめにセミオートマチックダイシングソーDAD323を用いてガラスキャピラリーを切断しガラスチャネルを得た後、直径 0.5 mm の ETFE 絶縁電線をガイドワイヤーとして通し、テフロンチューブを挿入し位置決めしてテフロンチューブの仮固定を行う。ETFE 絶縁電線のガイドワイヤーを抜きとり、本固定を行い、ガラスチャネルの接合部に対し、UV 硬化光学素子用接着剤を用いてシーリングを行った。未反応の接着剤を UV 照射により反応させ、余剰硬化樹脂を除去して多孔膜を有するガラスチップとして得た。この方法では、必要な作製時間はトータルで一時間以下であり、従来の手法と比較しても作製時間を大幅に短縮可能である。

## 3. ガラスチップの評価

第3章においては、作製したガラスチップの評価と結果についてまとめた。導入した多孔膜がミスアライメントなく導入され拡散機能を有するかどうかを確認し、またガラスチップ内部に導入された内液の蒸発や送液による漏れ出しがないかどうかの観点から性能評価を行った。作製したガラスチップを切断して断面観察を行ったところ、導入した多孔膜がミスアライメントなく導入されていることが確認でき、さらに蛍光物質 Rhodamine B を用いて拡散の様子を確認した結果、導入した多孔膜が作製工程を経ても拡散機能を有しているということを確認することができた。またガラスチップのガラスチャネルの接合部を UV 硬化光学素子用接着剤でシーリングすることにより、ガラスチップ内部に導入された内液の蒸発を低減し、送液時の圧力上昇による内液の漏れ出しを防止することが可能である。

ことがわかった。

#### 4. ガラスチップを用いた細胞観察・透過性評価とその応用

第4章においては、ガラスチップを用いた上皮細胞層の観察と透過性試験についての検討をまとめた。ガラスチップ内でヒト胎盤バリアのモデルに使用される胎盤絨毛上皮細胞 (BeWo 細胞) を培養して細胞層を形成させ、水平方向と垂直方向の二方向からの観察を行った。ガラスチップ内の多孔膜を対物レンズに対して水平に配置することで、細胞層の水平方向が観察可能であり、多孔膜を対物レンズに対して垂直に配置することで、細胞層の垂直方向が観察可能であることを示した。さらに、従来法で実施されている、細胞層の水平方向画像を多数枚取得して積層させて再構築した三次元画像から取得した、細胞層の垂直方向の画像と、ガラスチップを用いて一回のスキャンで獲得した細胞の垂直方向画像を比較したところ、解像度が従来法での手法よりも向上していることを示した。さらに、トランズウェルで実施されている蛍光マーカー分子 (FITC) を用いた透過率測定を実施し、細胞層を形成させた場合と PET 膜単体の FITC の透過率を比較し、細胞層を形成させた場合の方が透過率は低くなることを示した。また、PET 膜単体のトランズウェルの透過係数と同等のオーダーの値 ( $10^{-6} \text{cm/s}$ ) が得られており、このガラスチップの透過性評価ツールとしての応用可能性を示した。

#### 5. 結論

本研究では二つの四角形型ガラスチャネルで多孔膜を挟んだ構造のガラスチップを作製し、それを用いて上皮細胞を培養し細胞層を形成させることで、上皮細胞層の水平方向と垂直方向の二方向から形態観察が可能になることを示した。また、多孔膜を対物レンズに対して垂直に配置することで、二つのガラスチャネル間での蛍光トレーサー分子の移動がリアルタイムに可視化でき、ガラスチップの透過率法への応用可能性を示した。

以上、本研究で検討するガラスチップを用いることにより、創薬過程における上皮細胞の形態評価と透過性アッセイにかかる時間を短縮でき、研究や新薬開発効率を向上させることが可能と期待できる。