

博士論文

微小空間における細胞培養を利用した
複合的バイオアッセイシステムの開発

応用生命化学専攻

氏名 井村祐己

指導教員名 吉村悦郎

目次

1 章 序章

1-1	バイオアッセイ	1
1-1-1	バイオアッセイ	1
1-1-2	体内動態	2
1-1-3	生体作用と生理活性	4
1-2	マイクロチップ	5
1-2-1	マイクロチップ技術	5
1-2-2	細胞実験マイクロシステム	6
1-2-3	マイクロチップ生体モデル	7
1-3	本研究の目的および構成	8

2 章 マイクロチップの作製および実験材料と方法

2-1	マイクロチップの作製	1 2
2-1-1	マイクロチップ概要	1 2
2-1-2	マイクロチップの材料	1 2
2-1-3	SU-8を用いた鋳型の作製	1 3
2-1-4	マイクロチップの溶液導入部の作製	1 4
2-1-5	PDMS シートの作製	1 4
2-1-6	半透膜	1 5
2-1-7	PDMS シートの貼り合わせとマイクロチップの作製	1 6
2-2	培養細胞株	1 7
2-2-1	Caco-2 細胞	1 7
2-2-2	HepG2 細胞	1 7
2-2-3	MCF-7 細胞	1 7
2-2-4	MDA-MB-453 細胞	1 8
2-2-5	ZR-75-1 細胞	1 8
2-2-6	SK-BR-3 細胞	1 8
2-3	モデル試薬	1 9
2-4	生化学・分析化学実験方法	2 2
2-4-1	HPLC による物質定量	2 2
2-4-2	蛍光光度法による物質定量	2 2

2-4-3 SDS-PAGE	2 2
2-4-4 薄層クロマトグラフィー	2 3
2-4-5 物質透過試験	2 3

3章 マイクロチップ操作および細胞培養

緒言	3 6
3-1 マイクロチップの操作	3 6
3-1-1 操作環境	3 6
3-1-2 マイクロチップ内への細胞導入	3 7
3-1-3 マイクロチップへの送液	3 7
3-1-4 マイクロチップ観察装置	3 8
3-2 マイクロポンプ	3 9
方法	
3-2-1 マイクロポンプの設計	3 9
3-2-2 マイクロチップへ送気方法と制御	3 9
3-2-3 マイクロポンプの駆動	4 0
結果と考察	
3-2-4 蛍光ビーズによる溶液フローの観察	4 0
3-3 マイクロチップ内での細胞培養	4 1
方法	
3-3-1 水平流路内での接着細胞培養	4 1
3-3-2 ビーズ表面での接着細胞培養	4 1
3-3-3 培養支持膜状での接着細胞培養	4 2
3-3-4 マイクロチップ内での生存細胞数測定法	4 2
結果と考察	
3-3-5 水平流路内での接着細胞培養	4 3
3-3-6 ビーズ表面での接着細胞培養	4 4
3-3-7 培養支持膜状での接着細胞培養	4 5

4章 マイクロチップを用いた模擬臓器の開発

緒言	5 8
4-1 方法	5 9
4-1-1 マイクロチップを用いたバイオアッセイ	5 9
4-1-2 マイクロ消化管組織を用いた消化実験	5 9

4-1-3	マイクロ腸上皮組織を用いた物質透過試験	6 0
4-1-4	マイクロ肝組織による代謝を考慮したバイオアッセイ	6 0
4-1-5	マイクロ腎組織を用いた物質透過試験	6 1
4-1-6	マイクロポンプを用いた物質排出試験	6 1
	結果と考察	
4-2	マイクロ標的部位	6 2
4-2-1	マイクロチップの設計	6 2
4-2-2	バイオアッセイ	6 2
4-3	マイクロ消化管組織	6 3
4-3-1	マイクロチップの設計	6 3
4-3-2	物質消化試験	6 3
4-4	マイクロ腸上皮組織	6 5
4-4-1	マイクロチップの設計	6 5
4-4-2	物質透過試験	6 5
4-5	マイクロ肝組織	6 6
4-5-1	マイクロチップの設計	6 6
4-5-2	物質代謝試験	6 6
4-6	マイクロ腎組織	6 7
4-6-1	マイクロチップの設計	6 7
4-6-2	物質透過試験	6 7
4-7	マイクロポンプ	6 8
4-7-1	マイクロチップの設計	6 8
4-7-2	物質排出試験	6 8

5章 マイクロチップを用いた複合的バイオアッセイシステム

	緒言	8 1
5-1	方法	8 2
5-1-1	吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイ	8 2
5-1-2	消化・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイ	8 2
5-1-3	循環・排出を考慮に入れたバイオアッセイ	8 3
	結果と考察	
5-2	吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップ	8 4
5-2-1	マイクロチップの設計	8 4
5-2-2	バイオアッセイ	8 4

5-3 消化・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップ	86
5-2-1 マイクロチップの設計	86
5-2-2 バイオアッセイ	87
5-4 循環・排出を考慮に入れたバイオアッセイチップ	88
5-4-1 マイクロチップの設計	88
5-4-2 バイオアッセイ	88
6章 総合考察	104
参考文献	108
謝辞	119

略語一覽

CPA	cyclophosphamide
DTX	docetaxel
E2	17 β -estradiol
EPI	epirubicin
IF	isoflavone
LY	lucifer yellow
MEMS	micro electro mechanical systems
μ TAS	micro total analysis systems
MWCO	molecular weight cut off
PDMS	polydimethylsiloxane
TAM	tamoxifene
TESPA	thiotepa
TGF	tegafur
WRF	warfarin

1章 序章

1-1 バイオアッセイ

1-1-1 バイオアッセイ

バイオアッセイとは生物材料を用いて、生物学的応答から生物作用量を評価する方法である(池川, 1984)。日本語では生物学的検定法、生物学的(毒性)試験などと呼ばれている。バイオアッセイの標的として使用する生物材料は、個体レベルのものから細胞レベル、更には細胞内小器官や生体分子まで多様である。個体レベルのものとしては脊椎動物、無脊椎動物、藻類、細菌、酵母など。細胞レベルのものとしては培養細胞、単離細胞などが頻繁に用いられる。バイオアッセイは活性を測定するところに大きな特徴があり、化学物質の量を測定する物理化学分析手法では得られない様々な情報を得ることができる。薬剤やホルモンなどの生理活性物質は、官能基が一カ所異なるだけで活性が桁違いに上がることがしばしばあり、単純な物質量で比較できない活性の強さを評価することができる。

物理化学分析手法とバイオアッセイは相互補完的であり、様々な分野において重要な分析手法としての役割を担っている。医学・薬学分野においては古くからビタミンやホルモンの検定、薬剤の毒性試験や薬理効果の評価などでバイオアッセイが行われてきた。現在でも新薬開発の過程において、バイオアッセイは培養細胞を用いた試験から、動物実験、臨床試験へと展開していく。食品や化粧品などの分野においても毒性・機能性・親和性を評価するため、細胞などを用いたバイオアッセイが行われる。環境科学分野においても、生物に影響を与える有害物質を測定する方法としてバイオアッセイが期待されている。しかし、動物実験以降の試験は非常にコストが高く、また近年、動物実験は動物愛護の観点から削減の傾向にある。化粧品などの分野において動物実験は禁止された。そこで培養細胞を用いたバイオアッセイが有力な代替手法として期待されている。

培養細胞は動物実験に比べて倫理的に優れている点に加え、研究にかかるコストを削減できるなどの多くの点でメリットがある。しかしながら培養細胞を用いた実験では、生理活性物質がその細胞に対して与える効果しか評価することができず、実際の生体で起こる数々が生理活性物質に与える影響を評価することはできない。動物を用いた実験では標的となる組織だけでなく種々の生体作用を含めた総合的なバイオアッセイ

が可能となる。

1-1-2 体内動態

体内動態とは、体内へ取り込んだ物質が目的の臓器に到達して生理活性を発揮し、体外へと排出されるまでの過程を指す(図 1-1)。これは栄養学・薬学・環境科学の分野において重要な研究分野となっており、吸収・分布・代謝・排泄という、生体臓器が物質に及ぼす四つの作用が主な対象となる(カツツング, 2005)。食品の分野では更に消化の過程が加えられる。摂取した物質の体内における濃度はこれらの要素によって左右される。それゆえ、体内濃度を一定に維持するために必要な摂取量、摂取方法、摂取頻度を決定する際、これらは重要なパラメータとなる。体内濃度が不十分であれば期待される効果を発揮することができず、過剰量を摂取しては重篤な副作用を及ぼす恐れがある。また摂取だけでなく、体内からの除去も同様に重要なファクターである。体内での残留性の高い物質は概して高濃度となり易く、やはり副作用を及ぼす恐れがある。概して脂溶性の高い物質は残留性が高く、栄養素であっても摂取上限が定められているものもある。代表的なものでは脂溶性ビタミンであるビタミン A 過剰摂取による頭痛・催奇形性、ビタミン D 過剰摂取による腎障害などがある。

消化とは口から摂取した物質が口腔、食道、胃、十二指腸などの消化管において変性、分解される過程である。咀嚼による物理的な細分化に加えて唾液に含まれる消化酵素アミラーゼにより炭水化物の分解が起こる。食道では蠕動運動により更に細分化が進む。胃は pH が 2~3 という強い酸性環境にあり、この酸性によって物質の変性・分解が進む。また胃はタンパク質の消化酵素ペプシンを含んでおり、タンパク質の分解が進む。胃を抜けた物質は pH が中性に戻され、続く十二指腸にて膵液・腸液による消化を受ける。これらは多種多様な消化酵素を含んでおり、糖やペプチド、脂質や核酸などが分解を受ける。これらを経たのちに到達する腸にて吸収される。

吸収とは摂取した物質が毛細血管へ移行する過程である。腸の上皮細胞はそれぞれがタイトジャンクションにより周囲の細胞と結合しており、その結果体腔内の物質が体内へ自然には入り込まないようにしている。腸上皮細胞はその頂端側と測底側で異なる膜タンパク質を有しており、その結果体腔から体内への一方向への物質透過が可能となる。頂点側には特に数多くのトランスポーターが発現しており、栄養素や薬剤などの吸収に深く関わっている。

体内へ吸収された物質は、肝門脈を通り肝臓へ輸送される。肝臓ではシトクロム P450 を始め、様々な代謝酵素が発現している。腸から吸収された物質は一度肝臓を

通過せねばならないため、ここでの肝代謝が薬剤などに与える影響は初回通過効果として入念に調べられる。消化、吸収、代謝というここまでの過程がバイオアベイラビリティとして評価され、特に薬学の分野において重要なパラメータとされる。

肝臓を経た物質は循環系に入り、全身の細胞へ行き渡る。薬物や食品機能性成分はここで初めてその効果を発揮することが出来る。生理活性物質の作用により、標的となる組織に影響が及ぼされる。この過程はバイオアクティビティとして、よく研究されている。

生体では摂取した生理活性物質がいつまでも体内に留まることはなく、それらは体内の除去機構により排泄される。その際重要な役割を果たす臓器は腎臓と肝臓である。腎臓は血中の二酸化炭素や尿素などの不要物を尿として体外へ排泄する器官であり、薬物などもここで排泄される。また別の排泄経路として、肝臓が薬物を胆汁に乳化して腸腔へ送るものが知られている。

腎臓や肝臓で行われる排泄は体内の全量が一斉に除去されるような過程ではなく、循環系を巡る間に次第に行われる過程である。言い換えると、生理活性物質の濃度は時間がたつにつれ減衰していく。この減衰度合いは、ある濃度から半分の濃度になるために要する時間(半減期)により評価される(坂井ら, 2008)。

薬物の投与は以上のような生体作用の影響を考慮した上で行われる。すなわち、胃の酸性環境で分解してしまうようなものはカプセルを用いて投与する、腸上皮を隔てた吸収が悪いものは静脈注射をして用いる、肝臓で代謝消失しやすいものは直腸内投与にて用いる、排泄具合によって投与間隔を決定するといった具合である。近年ではこれらの生体の作用を利用するような薬剤も開発されている。例えば腸吸収されにくい薬剤をプロドラッグ化して吸収能を上げ、肝代謝を経ることで活性をもつようにして副作用を抑えるといった手法などである。

生体作用を評価するために *in vitro* および *in vivo* の種々の実験が行われている。物質の体内への吸収を評価するために、腸上皮由来細胞とセルカルチャーインサートを用いた実験がしばしば行われる。物質の代謝を評価するために代謝酵素・肝由来細胞・肝初代培養細胞・肝スライスなどのモデル臓器を用いた実験が行われる。分布および排泄はマウスなどの実験動物を用いた *in vivo* 実験が主流であるが、これらに大きく関与するパラメータである血漿タンパク質結合率の測定など *in vitro* 実験も行われる。

1-1-3 生体作用と生理活性

生理活性物質の研究を行うとき二種類のアプローチがなされる(カツツング, 2005)。すなわち、

- ・生理活性物質が生体に及ぼす作用の評価(生理活性)
- ・生体が生理活性物質に及ぼす作用の評価(生体作用)

である。前者の手法がバイオアッセイであり、後者の手法が各種体内動態分析である。体内動態は生理活性に大きく影響する因子でありながら、これらは通常独立に評価が行われる。体内動態を考慮に入れた生理活性分析は疾患モデルマウスなどを用いた動物実験、あるいはバッチ方式の実験で行われている。バッチ方式の実験を行う場合、検討が行われるのは一項目の生体作用であることが多い。すなわち、腸管での吸収を経た後に残存している生理活性の評価、あるいは肝臓での代謝を経た後に残存している生理活性の評価といった実験が行われ、種々の生体作用を網羅的に検討した上でバイオアッセイが行われることは少ない。また、*in vitro* 実験システムで、生体作用と生理活性の複合アッセイが行われることは存在する。セルカルチャーインサート内で腸上皮由来の細胞を培養し、ウェル内部でバイオアッセイの標的となる細胞を培養するシステムを用いると、物質の吸収と生理活性を同時に評価することができる(渡辺, 2006)。しかし、複数の生体作用を施した上で生理活性の評価を行うシステムは存在していない。

1-2 マイクロチップ

1-2-1 マイクロチップ技術

マイクロチップ技術とは、数センチ角の基板上へ化学反応や前処理・分離精製・物質検出といった機能を集積する技術である。スライドガラスなどへマイクロスケールの微細な造型を施し、その微細な流路上へ液体や気体などを導入して種々の反応を連続的に行う。1970年代にスタンフォード大学の Terry らによって、微細加工を施した基板上へ化学分析システムを構築する研究が発表された(Terry *et al.*, 1979)。1990年代に入り、半導体加工技術を利用した機械工学的な応用として、基板上に施した微細加工技術を用いた電氣的な検出、機械的な駆動を利用したマイクロシステムとして、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術といった電気、機械系のマイクロチップ分野が創製された。この分野は特に医療用機器の開発を目的として進められ、現在でも一つの分野として根付いている。一方、同じく1990年代初期に Manz らが微細加工を施した基板上で全ての分析操作を行う Micro Total Analysis Systems (μ TAS) を提唱した (Manz *et al.*, 1994)。以来マイクロチップの分析化学分野への実用化に向けた研究が急速に進められ、約10年間でDNAマイクロアレイ・プロテインチップ・電気泳動チップなどのマイクロ分析チップが製品化されるまでに至った。DNAマイクロアレイはシリコンなどの基板上に任意のDNA断片を整列配置固定し、それらの断片と相補的に結合するDNA断片を蛍光検出するなどして高速・高感度に分析する技術である。現在でも分子生物学的解析や遺伝子診断など多くの場面で利用されている。マイクロアレイは微小な領域に固定した反応領域を用いて分析を行ういわゆるバッチ式の分析手法であるのに対し、溶液などの流れを利用したマイクロチップ技術はフルイディックチップとして発展してきた。電気泳動チップ・プロテインチップなどはフルイディックチップに分類され、電気泳動による物質分離や電気浸透流による駆動力を用いた分析手法として広く利用されている。電気泳動を利用するフルイディックチップは、電荷を持つDNAやタンパク質の分析に使われるが、電荷のない試料の分析には使用できない。そこで、より汎用性の高い流体制御技術としてポンプによる駆動力を利用した圧力駆動式のフルイディックチップが注目されてきた。比較的高い圧力での送液や、細胞などの大きな物体を導入することができるなどの汎用性が期待されている(北森ら, 2004)。

1-2-2 細胞実験マイクロシステム

通常、培養細胞を用いた研究としては、直径数 mm のウェルが並んだマイクロタイタープレートと呼ばれるポリスチレン製の容器や直径数 cm のシャーレといった容器を使う。このサイズは人間から見て取り扱い易いという基準で決められているものであり、細胞にとってみれば不自然に大きな空間である。それに比べてマイクロチップは、数十 μm から数百 μm オーダーのサイズであり、細胞から放出された物質が大量の培地で希釈されることがなくなり、生体に近い環境で実験を行うことが可能である。細胞培養実験をマイクロチップで行うことの利点として、反応空間が極めて小さくなるために細胞や培地などの少量化が図れること、ピペットによる煩雑な操作が不要となることなどが挙げられる。マイクロチップでは、細胞に培地や試薬類を作用させるマイクロチャンネルや、細胞から放出された成分や破碎して細胞から取り出した成分を反応・分離・測定するための機能を集積化することが可能であり、実験の飛躍的な効率化が期待できる。

細胞実験マイクロシステムの実現にあたり、基盤となる要素技術としてマイクロチップ内での細胞の保持が挙げられる。動物細胞は接着細胞と浮遊細胞の2つに分類できる。接着細胞は固体表面に接着することによりはじめて増殖し、様々な活性を示すことが知られている。一方、浮遊細胞は固体表面に接着することなく増殖し、様々な活性を示す。接着細胞ではマイクロチップ内部に細胞を接着させるための部位を形成し、細胞を接着させたい固相表面をコラーゲンやフィブロネクチンなどのタンパク質をはじめとする細胞外マトリックスでコーティングする方法が効果的な接着法として知られている (Davidsson *et al.*, 2004)。現在までにこの細胞保持法を用いた細胞実験マイクロシステムとしては抗癌剤感受性試験用マイクロチップなどが開発されている (Fujii, *et al.*, 2006)。

一方で浮遊細胞は固相表面に接着しないため接着細胞とは異なる細胞保持法が要求される。浮遊細胞の保持法としては、細胞が下流に流れないように流路に垂直に多孔質膜を張り、その部分で細胞をトラップする方法などが報告されている (Tokuyama, *et al.*, 2005)。

1-2-3 マイクロチップ生体モデル

近年生体臓器を模したマイクロチップの研究が盛んに行われ、様々な分析に利用されている。Organ-on-a-chip アプリケーションと呼ばれるこの分野はマイクロチップ分析技術において重要な位置を占めている(Langer *et al.*, 2004; Baker, 2011; Gao *et al.*, 2012)。

マイクロチップ上に肺の構造を構築し、上皮側と内皮での気体の流動を測定するシステム(Huh *et al.*, 2010)、腫瘍組織をチップ上で三次元培養したシステム(Elliott *et al.*, 2011)、物理・化学刺激による骨格筋の収縮をチップ上に再現したシステム(Shimizu *et al.*, 2009; Kaji *et al.*, 2010)、ニューロンネットワークを形成させるマイクロチップシステム(Zeck *et al.*, 2001)、卵母細胞と精子をマイクロチップ上で受精させるシステム(Ma *et al.*, 2011) などが研究されてきた。

また、これらの生体モデルを複数搭載したシステムの研究も行われてきた。肝臓・腫瘍組織・骨髄由来の細胞を一つのチップ内で培養した研究(Sung *et al.*, 2010)。肝臓・肺・腎臓・脂肪組織由来の細胞を一つのチップ内で培養した研究(Zhang *et al.*, 2009)などが報告されている。これらは複数種類の細胞を一つのチップで共培養したものであり、各細胞が産出する生体由来物質の相互作用を分析することが可能である。

木村らはマイクロチップ内で腸上皮のレイヤーを作製し、細胞による物質の選択的透過を行う手法(Kimura *et al.*, 2008)、および腸上皮レイヤーの basolateral 側に肝臓細胞を培養してバイオアベイラビリティを評価する手法(Kimura *et al.*, 2008)を報告している。しかしこの手法はスターラーを利用した送液を行っており、マイクロチップ内にありながらバルクと変わらないスケールのシステムとなっている。更に流速を自由に設定できない上、他の臓器の追加搭載が難しいなど多くの課題を抱えている。

1-3 本研究の目的および構成

1-1 でも述べたように、培養細胞を標的として用いたバイオアッセイに注目が集まっている。バイオアッセイでは、シャーレなどに培養された細胞に薬剤などを添加し、蛍光染色法 (Calcein efflux assay など) や (Vellonen, *et al.*, 2004)、発色法 (MTT assay など) (Slavotinek, *et al.*, 1994) により評価を行うのが現在の主流である。しかし、現在行われている多くのアッセイは標的細胞に対してどのような効果があるのかという点のみを検定するものであり、複雑なプロセスを経て実際の生体で示すと期待される効果を総合的に判断することは出来ない。つまり、人体で起こる消化管での消化や腸管での吸収、肝臓での代謝といったプロセスが考慮に入られてないのが重大な問題点として挙げられる。標的細胞への効果を評価するに当たって、体内からの除去率なども見逃すことの出来ない重要なパラメータである。また、サンプルが貴重で十分な量を確保できない場合などでは、より少ない細胞数でのアッセイ、そしてそれに伴う高効率高感度な分析法の確立が求められている。また、近年の創薬の初期段階における新規合成化合物の数は極めて多く、新規合成化合物のスクリーニングに使用する試薬や細胞の量の微量化や、煩雑な操作の解消によるハイスループット化など、培養細胞を用いたバイオアッセイには多くの課題が課せられている。

そこで本研究では、大きく二つの目標を掲げた。

- ・消化、吸収、代謝、それらを踏まえたうえでの物質の生理活性——すなわちバイオアベイラビリティとバイオアクティビティを複合的に評価するシステムの構築。
- ・循環、排出を踏まえたうえでの物質の生理活性——すなわち残留性とバイオアクティビティを複合的に評価するシステムの構築。

これらをマイクロチップ上に集積することにより、アッセイにおいて消費する試薬や細胞の微量化、複雑な実験操作の解消を目指した。

具体的にはマイクロチップ内で流路を立体的に作製し、生体臓器を模した部位を直列に配置した。模擬臓器部位として搭載したのは、人工消化液を用いて模擬的な消化を行う模擬消化管部位、腸上皮由来の細胞による選択的な物質透過を行う模擬腸上皮部位、肝臓由来の細胞による物質代謝を行う模擬肝部位である。これらの下流にバイオアッセイの標的細胞を培養する標的部位を設置した。培地や試薬の送液は、シリッジポンプの駆動により行った (図 1-2)。このシステムによりバイオアベイラビリティとバイオアクティビティの複合評価を試みた。

もう一方は透析膜と、マイクロチップに内蔵してチップ内部で液体を循環させられるマイクロポンプからなるバイオアッセイシステムである (図 1-3)。透析膜を通して物質の

排出を行う模擬腎部位、チップ内部に設置した閉鎖流路の液体を循環させるマイクロポンプを一つのチップに搭載し、閉鎖流路内に含まれる生理活性物質が経時的に減衰していくシステムを作製した。この閉鎖流路内でバイオアッセイの標的細胞を培養することで、残留性を考慮した上でバイオアッセイを行うことができるシステムの開発を試みた。

本研究では標的細胞として、ヒト乳癌由来細胞を使用した。乳癌細胞は抗癌剤で死滅し、エストロゲン様活性物質で増殖促進することが知られている (Ciocca *et al.*, 1992)。すなわち、生理活性を細胞の生存という測定が容易なアウトプットで評価することができると考えた。

本論文の構成は以下のとおりである。

この1章では研究全体の背景と目的および構成について述べた。

2章では、本研究にて用いる材料と実験方法について述べた。その内訳はマイクロチップの作製、マイクロチップ内蔵型のマイクロポンプの作製、培養細胞株、モデル試薬、生化学・分析化学実験手法である。

3章では、バイオアッセイを行うにあたって必要な、マイクロチップ操作技術の構築を行った。内容はマイクロチップ搭載型の小型ポンプの開発とマイクロチップ内で細胞を培養する技術の構築である。本研究では、模擬臓器部位の構成に培養細胞を使用した。そのため細胞の用途に応じた培養法を確立する必要があり、それぞれに適切な培養法をこの章で検討した。

4章では、3章で確立した細胞培養法を利用して、生体臓器の機能を模したマイクロシステムの開発を行った。生理活性物質の標的となる細胞を培養した標的部位、胃や腸などの消化管部位、腸管での吸収を評価する腸上皮部位、肝臓での代謝を評価する肝部位、糸球体での濾過を評価する腎部位、流路を循環させるマイクロポンプの検討をそれぞれ行った。

5章では複合的なバイオアッセイを行うマイクロシステムの開発を行った。開発したのは腸上皮・肝臓・標的部位からなるマイクロチップ、消化管・腸上皮・肝臓・標的部位からなるマイクロチップ、腎臓・マイクロポンプ(心臓)・標的部位からなるマイクロチップである。前者2つはバイオアベイラビリティを考慮したバイオアッセイを行うものであり、後者は残留性を考慮したバイオアッセイを行うものである。それぞれに対して性状の異なるモデル試薬を用いてバイオアッセイを行い、システムの妥当性を評価した。

最後に6章では研究全体の考察を行った。

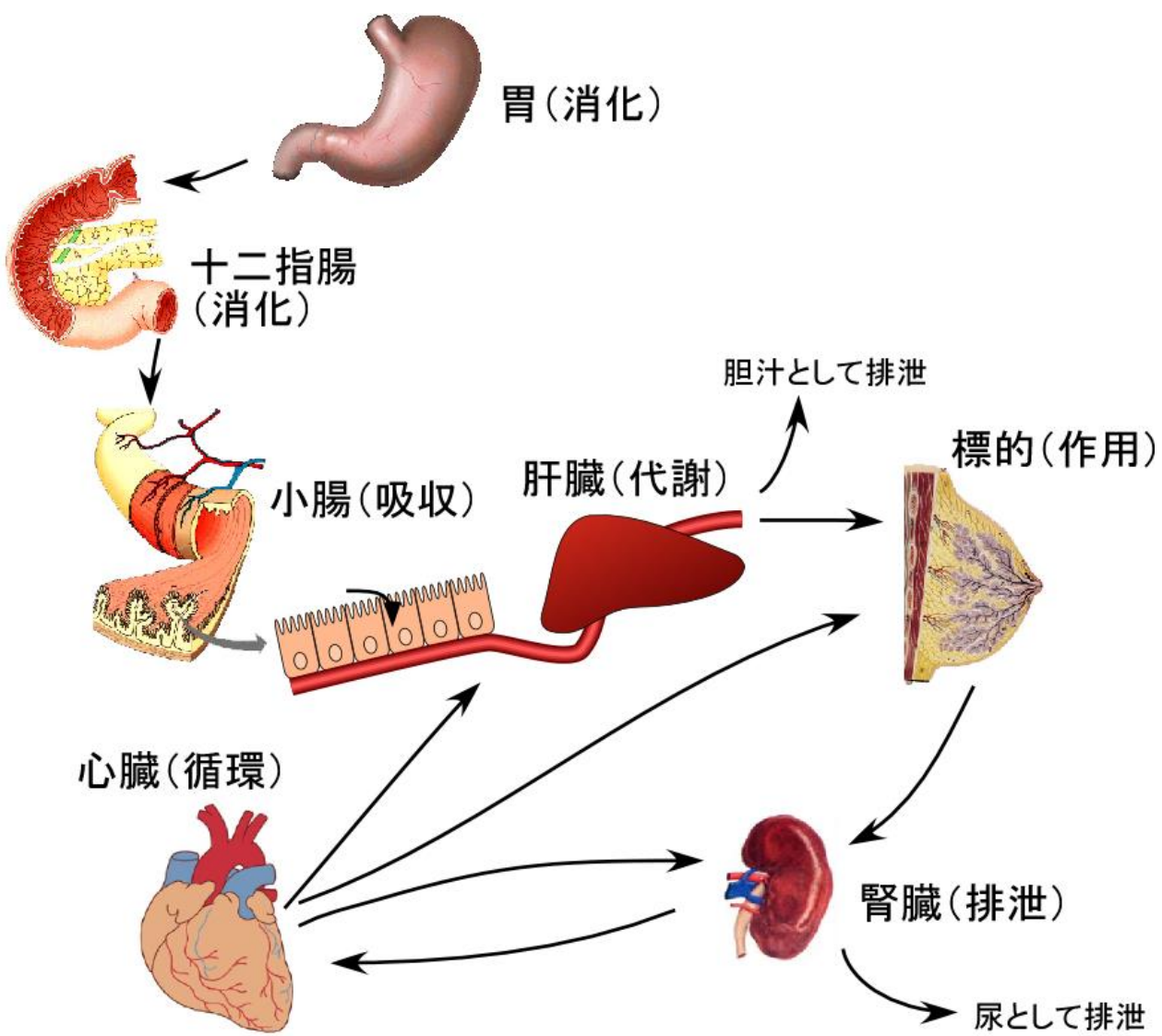


図 1-1 経口摂取した生理活性物質に対する生体作用概略図

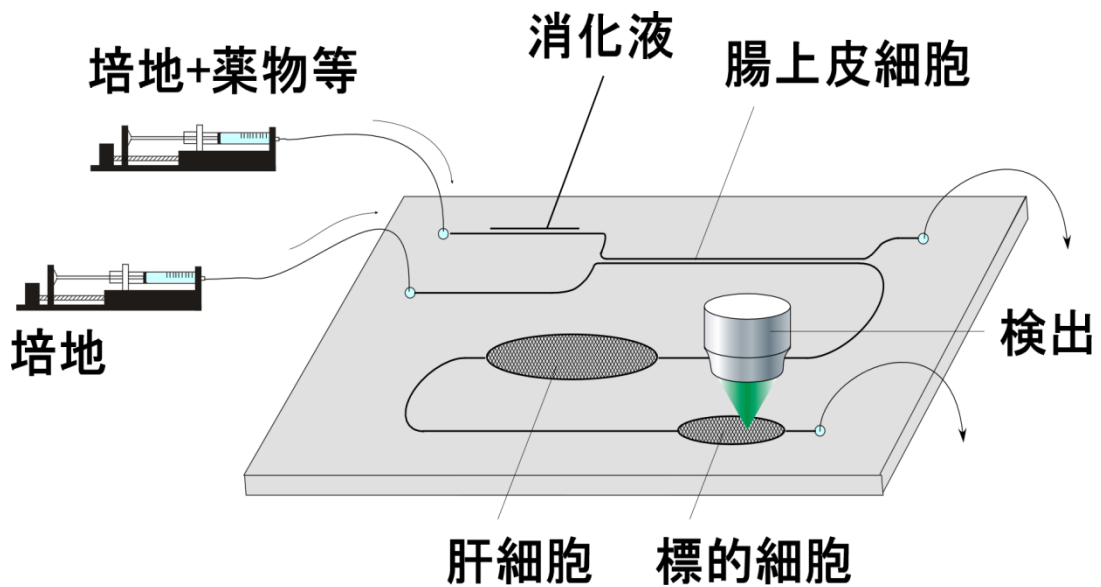


図 1-2 消化・吸収・代謝を考慮に入れた
バイオアッセイチップの概念図

チップへ導入された薬物などの試料は消化液で消化され、腸上皮細胞により選択的に吸収される。その後、肝細胞により代謝を受ける。以上の過程を経た薬物がバイオアッセイの標的細胞に対して活性を発揮する。薬物はシリンジポンプを用いて継続的に供給される。

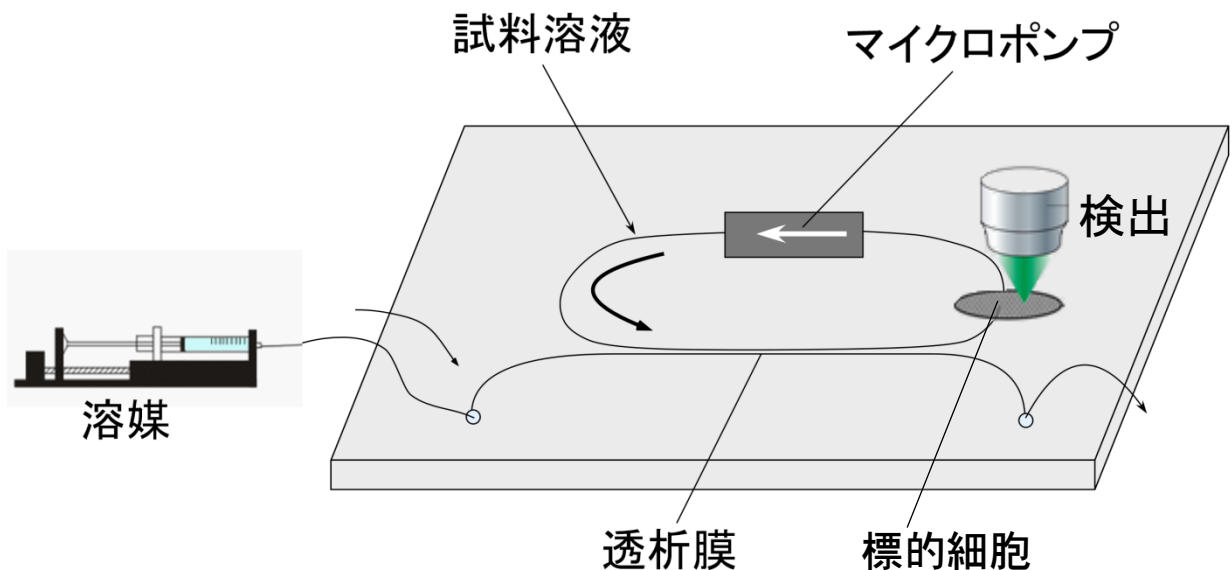


図 1-3 循環・排出を考慮に入れた
バイオアッセイチップの概念図

試料溶液は閉鎖流路に充填されており、マイクロポンプにより循環が行われる。試料の一部は透析膜を透過し、閉鎖流路外へ経時的に排出される。残留した試料のみが標的細胞に対して活性を示す。

2章 マイクロチップの作製および実験材料と方法

2-1 マイクロチップの作製

2-1-1 マイクロチップ概要

マイクロチップは異なる流路造型を持つシートを複数貼りあわせることにより作製した。凸型の造型を施した鋳型の周囲に枠を作製し、その中に熱硬化性樹脂を流し込んだ。熱をかけて固化した後、鋳型から外すとフラットで凹型の造型が施されたシートを得た。このフラットな面を別の平らな面と貼りあわせることで、凹型の造型が閉じた流路として活用した。また、立体的な構造を作製するために水平流路だけでなくシート内部を垂直に貫く垂直流路を作製した。更にマイクロチップへの溶液の導入・排出のためのコネクタ(導入ポート)を設置した。本研究で用いるマイクロチップは、上層に設けられた溶液導入路によってシリンジからのラインと接続した(図 2-1)。

2-1-2 マイクロチップの材料

バイオアッセイに用いる基材の条件を以下に列挙する。まず、細胞に対して毒性を持たないこと、化学的に不活性なことが必要である。光学的な観察を行うため、可視波長域に吸収や蛍光特性を持たないことが要求される。さらに、本研究ではマイクロチップを積層し、層と層の間に膜を挟み込むことで細胞保持を行った。そのため、異物を挟み込むための柔軟性が求められる。これらを満たすマイクロチップ材料としてシリコン系樹脂であるポリジメチルシロキサン(PDMS)をマイクロチップの材料として用いることとした(Yamada, *et al.*, 2003, Takayama, *et al.*, 2003)。PDMS は細胞を用いたマイクロチップの基材としても用いられており、細胞毒性は無いことが知られている(Folch, *et al.*, 2005)。通気性の高い樹脂であり、適度に内部の空気が交換されることも細胞の培養に都合が良い。さらに、ゴム状の樹脂であるため膜など薄い異物の導入および固定が可能となる。また PDMS は硬化性樹脂であるため、鋳型から作製された PDMS マイクロチップは高精度で同型となる。そのため多検体バイオアッセイの際に誤差の少ない比較が可能となるため、PDMS は基材として優れた特徴をもつと考えた。

PDMS の作製法を図 2-2 に示す。SILPOT184W/C(ダウコーニングアジア)の主剤の A 液と、架橋剤である B 液を 10:1 で混合し、よくかき混ぜた後 1h 脱気したものを

PDMS 原液とした。PDMS 原液は-20°C で保管し、固化には加熱操作を行った。

2-1-3 SU-8 を用いた鋳型の作製

PDMS シートに対する造型を行うための鋳型として、高膜厚型フォトレジスト SU-8 を用いた (Lorenz, *et al.*, 1998)。SU-8 は光照射により硬化するエポキシ樹脂ベースのネガ型のフォトレジストであり、照射部をマスクにより制限することで目的とする造型を作製可能である。ガラス基板上に SU-8 を塗布して光照射を行った後、硬化させなかった部分を溶解させて現像することで目的とする凸型構造物を得ることができる。鋳型作製にあたって、目的とする流路高によって SU-8 の種類や作業時間などの諸条件を変化させた。また作製する PDMS シートも厚さによって加熱条件を変化させた。これらをまとめて表 2-1 に記す。SU-8 を用いた微細造型技術の概略を図 2-3 に、具体的な方法を以下に示す。

すべての作業は暗室で行った。暗室内の照明にはフォトレジストが感光しない半導体工場用蛍光灯 (波長 500 nm 以下の光をカット) を用いた。基板に用いるガラスは顕微鏡用スライドガラス (S-7213、松浪硝子工業社製) を用いた。これをエタノールに浸漬し、超音波洗浄した。フォトレジストは SU-8 (化薬マイクロケム) を用い、現像液には SU-8 Developer (化薬マイクロケム) を用いた。流路パターン設計は Adobe Illustrator を用いてパソコン上で行った。作製したパターンをフィルム上に印刷したものをフォトマスクとして利用した。フィルム上への印刷は㈱帆風に外注し、製版フィルム上にイメージセッタを用いて、200 線高精度印刷で行った。

SU-8 の塗布膜厚は用いる SU-8 の種類とスピンコーターの回転数によって調整した。回転をかけることでスライドガラス上に均一になるように SU-8 を塗布した (図 2-3-a)。始めの 5 s 間で回転数を 500 rpm に上昇させ、その状態で 10 s 回転させた。次の 5 s で、更に速い回転数へ上昇させ、この速度で 30 s 回転させることで SU-8 を均一にした。

プレベイクとして 95°C に設定したホットプレート (ND-1, アズワン) 上に SU-8 を塗布した基板を一定時間置いた。この工程は溶媒を蒸発させ膜を高密度化するために行った。

SU-8 の固化条件は 350 nm~400 nm の波長の露光に最適化されているため、UV ランプを用いて露光工程を行った。SU-8 面に密着するようフォトマスクを重ね合わせ (図 2-3-b)、一定時間露光を行った (図 2-3-c)。

ポストベイクとして 95°C に設定したホットプレート上に SU-8 を塗布した基板を一定時間置いた。

現像はフォトレジスト塗布基板を現像液である SU-8 Developer に浸漬し、未露光部分の SU-8 が完全に解け落ちるまで超音波洗浄を行った。現像液から引き上げ、2-プロパノールでリンスを行い、水分をよく拭き取った後、鋳型として用いた(図 2-3-d)。

2-1-4 マイクロチップの溶液導入部の作製

マイクロチップへの溶液の導入/排出のためのコネクタの設計を図 2-1 左下に示す。細胞を使用する本研究では、溶液や細胞をマイクロチップへ導入する必要がある。よって、溶液および細胞の導入ができるよう溶液導入部の設計を行った。溶液導入部はキャピラリーチューブ先端の接続口を容易に手差しできるよう硬質のチューブ構造とし、細胞を一定量導入するために内径 1 mm のテフロンチューブ (o.d.=2 mm, MRC) を使用した。テフロンチューブは高さ 10 mm で約 7.9 μL の容量である。テフロンチューブはマイクロチップ基材の PDMS との接着性が弱いため、このチューブの外側にさらに PDMS と強力に接着するシリコンチューブで覆う 2 層構造とした。これを導入ポートと呼ぶ。

マイクロチップ内には複数の模擬器官が構築されており、複雑に区画化されている。そのため導入ポートにより全経路がオープンになっていると特定部位だけを操作する際に不都合が生じる。そのため導入ポートを手軽に開閉できる栓を作製した。内径 2 mm のシリコンチューブを 1 cm の長さに切断し、片面を PDMS で密閉したものを栓として使用した。

2-1-5 PDMS シートの作製

本研究で作製した PDMS シートは 3 種に分類される。①シートの下面がフラットかつ流路が造型されており、逆面に導入ポートを持つシート(以下上層シート) ②シートの上下両面がフラットでかつ流路が造型されている PDMS シート(以下中層シート) ③シートの下面がフラットかつ流路が造型されており、シート厚が極めて薄い(50-150 μm)シート(以下薄層シート)。それぞれについて詳細な作製方法を以下に記述する。

①鋳型に導入ポートを設置し、少量の PDMS で位置がずれないように固定した。その後、鋳型周囲を透明粘着テープで丁寧に囲い、枠を作製する。作製した枠の内部へ PDMS を流し込み、70°C のオーブン中で 30 min 重合させることで上層シートを得た。導入ポート内部に溜まった PDMS は針を用いて除去した。(図 2-4-A)

②下側の鋳型に垂流路となるテフロンチューブを立て、隅に高さ約 3 mm の PDMS のスペーサーを設置した。次に、もう一枚の鋳型を造型面が内側にくるようにス

ペーサーなどの上から重ねた。スライドガラスの周りを透明粘着テープでシールした後、横倒しにして PDMS を流し込んだ。70°C で 40 min 放置した。PDMS が固まったら当面粘着テープと両面の鋳型をはずし、得られた PDMS シートに埋め込まれたテフロンチューブを抜いて垂直流路を作製した。流路の幅により使用するテフロンチューブを変えた。用いたチューブの規格は表 2-2 の通りである。(図 2-4-B)

③鋳型に PDMS を塗布し、スピンドーターの回転数を調整することで PDMS を必要な高さ(1 mm 以下)まで薄く展ばした。その後ホットプレートの上で加熱することにより目的の PDMS シートを得た。垂直流路は針を用いて穴を開けることにより確保した。この PDMS シートは非常に薄いため鋳型から剥がして利用することが困難である。そのため、対になる PDMS シートと予め貼り合わせた後に鋳型からはずした。(図 2-4-C)

2-1-6 半透膜

マイクロチップ内で2つの並行する流路を隔て、流路間で物質透過を行わせるための素材として2種の半透膜を使用した。一つは透析膜である。これは物質の分子量に従って透過性を決定する分子ふるいの役割を果たし、生体における腎臓の糸球体毛細血管壁の機能に相当する。セルロースヴィスキングチューブ(アズワン: MWCO=12,000)を熱湯に5 min 浸し、開いて一重構造にした。その後適切なサイズに裁断した。透析膜片はしわを良く伸ばした状態で一晩乾燥させ、PDMS シートに挟み込む際の障害を極力排除した。乾燥した透析膜片はクリーンベンチ内殺菌灯にて1 h 滅菌を行った。

もう一つは細胞培養用透過性コラーゲン膜である。これは上面で細胞培養を行い、選択的な物質透過を *in vitro* で行うための半透性支持膜であり、腸壁での物質の選択的な吸収を模することができる。fibrillar collagen pre-coated inserts (BD BioCoat cell culture inserts fibrillar collagen, Type I Rat Tail, 1.0 μm pores; BD Biosciences; 以下培養支持膜) の多孔質膜を適切な形に裁断したものを使用した。孔径は 1.0 μm と大きく、生体は通さないが巨大分子でも透過することが可能である。

2-1-7 PDMS シートの貼り合わせとマイクロチップの作製

PDMS マイクロチップは凹型流路構造を有する PDMS シートと別の基板を貼り合わせることによって閉じた水平流路を得る。PDMS は自身の接着力で PDMS シート同士またはガラス基板と接着できるが、耐えられる圧力には限界がある。そこで半永久的な接着を得るため、プラズマリアクターによる酸素プラズマ処理による接着 (Duffy, *et al.*, 1988) を行った。接着面を、酸素流量 40 mL/min、25°C、0.1 MPa の条件下で、出力 240W で 3 s プラズマ処理を行い貼り合わせた。

下層 PDMS シートの底はスライドガラスと貼りあわせた。PDMS よりもスライドガラスの方が細胞培養用修飾に適している。フラットな PDMS シートを最下層の基板として使用すると、細胞培養の際同素材で構築されている細胞導入用垂直流路などにも細胞が接着することが懸念され、標的としたチャンバーのみに培養することが困難になる。

また、各種半透膜は PDMS シート同士の間挟み込んだが、プラズマ処理で燃え尽きてしまうため膜はプラズマ照射を行わなかった。予めプラズマ照射した中層シートの上面に膜を設置し、上層シートをプラズマ処理して貼りあわせを行った。

2-2 培養細胞株

2-2-1 Caco-2 細胞

細胞レイヤーを形成する細胞としてヒトの結腸癌由来細胞株 Caco-2 (図 2-5-A) 細胞を選定した。本細胞は理研バイオリソースセンターより入手した。形態的特徴として上皮様の扁平な形をしており、多孔質膜上などで単層を形成する。また、隣接する Caco-2 同士、タイトジャンクションを形成し、物質の透過を制御するため、食品・環境・創薬などの分野において、腸管における透過性を調べるための標準的な透過性スクリーニングアッセイとして広く用いられている (Konishi., 2003)。

培地は Minimum Essential Medium Eagle (MEM; SIGMA) を用いた。10% (v/v) Fetal Bovine Serum (FBS; GIBCO)、100 units/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシン (GIBCO)、1% MEM Non-Essential Amino Acid Solution (NEAA, SIGMA) を培地へ添加した。Caco-2 細胞の継代期間は約 3~6 日である。

2-2-2 HepG2 細胞

物質代謝を行う細胞としてヒトの肝癌由来細胞株 HepG2 (図 2-5 B) 細胞を選定した。上皮様の扁平な形をした細胞である。HepG2 細胞はヒト肝癌細胞の中でも多くの生体異物代謝活性を維持しており、薬剤など生体異物の肝臓における代謝の評価に幅広く用いられている (Yoshitomi, *et al.*, 2001; Rueff, *et al.*, 1996)。

培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; SIGMA) を用いた。10% (v/v) FBS、100 units/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシンを培地へ添加した。HepG2 細胞の継代期間は約 3~6 日である。

2-2-3 MCF-7 細胞

生理活性物質の標的となる乳癌細胞としていくつかの細胞を使用した。そのうちのひとつはヒトの乳癌由来細胞株 MCF-7 (図 2-5-C) である。上皮様の扁平な形をしている。この細胞は種々の抗癌剤によって死ぬことが知られており (Chow, *et al.*, 2003)、またエストロゲン活性依存的に増殖が促進されることが知られている (Morito, *et al.*, 2001)。

培地は、RPMI1640 Medium (RPMI1640; GIBCO) を使用した。FBS; GIBCO) を

使用した 10% (v/v) FBS、100 units/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシンを培地へ添加した。MCF-7 細胞の継代期間は約 3～6 日である。

2-2-4 MDA-MB-453 細胞

MDA-MB-453 細胞はヒトの乳癌由来細胞株であり、球形をした細胞である(図 2-5-D)。L-15 培地(インビトロジェン)に 10% (v/v) FBS、100 units/mL ペニシリン・100 µg/mL ストレプトマイシンを培地へ添加した培地で、37°C CO₂ 濃度 0% (通常大気)で培養した。細胞の継代期間は約 2～4 日である。

2-2-5 ZR-75-1 細胞

ZR-75-13 細胞はヒトの乳腺管癌由来細胞株であり、扁平な形状の細胞である(図 2-5-E)。培地は RPMI 1640+ 10% FBS + 1% NEAA +抗生物質で、継代期間は一週間程度である。

2-2-6 SK-BR-3 細胞

SK-BR-3 細胞はヒトの乳癌由来細胞株であり、球形をした細胞である(図 2-5-F)。培地は RPMI 1640+ 10% FBS + 1% NEAA +抗生物質で、継代期間は一週間程度である。

2-3 モデル試薬

(a) シクロホスファミド (CPA)

CPA は主に経口投与で用いられるプロドラッグ型の抗癌剤である。主に肝臓にて human cytochrome P450 2B6 (CYP2B6) によって活性化される (Chang, *et al.*, 1993)。CPA はそれ自体では活性を有さないが、図 2-6 に示したように代謝され、代謝産物ホスホラミドマスタードおよびアクロレインが得られる。ホスホラミドマスタードは強いアルキル化能を有しており、DNA のグアニンをアルキル化することにより、核酸合成を強く阻害する (Alabaster, *et al.*, 1979)。

(b) ルシファーイエロー (LY; 図 2-7)

LY は $Ex = 428 \text{ nm}$, $Em = 536 \text{ nm}$ で蛍光を発する水溶性物質であり、細胞膜をほとんど透過しない。そのため細胞トレーサー試薬として頻用される (Macagno *et al.*, 1981)。その他、生体膜透過試験において生体膜の非透過性物質のモデル試薬として用いられる。

(c) エピルビシン (EPI; 図 2-8)

EPI は主に静脈注射投与される抗癌剤である。DNA の螺旋構造の間に入り込むことで DNA, RNA の合成を阻害し (Ganzina, 1983)、トポイソメラーゼ II に対しても阻害を行う (Petit *et al.*, 2004)。肝臓にてグルクロン酸抱合を受けて胆汁中へ排出されることにより、体内から除去される (Zaya *et al.*, 2006)。

(d) エストラジオール (E2; 図 2-9)

E2 は女性ホルモンであるエストロゲンの一種で、最も強い生理活性を有する。ステロイドホルモンであるエストロゲンは細胞膜を容易に透過し、細胞内のエストロゲン受容体と結合して活性を示す。乳癌の多くはエストロゲン依存的に増殖することが知られている。E2 は卵巣や副腎皮質で生産され、尿中へ排出される。このため生活下水には E2 が含まれ、河川の魚類がメス化する等の環境問題が発生した。代謝は主に肝臓で行われ (Lee *et al.*, 2003)、グルクロン酸抱合を受ける。

(e) 大豆イソフラボン (IF; 図 2-10)

大豆イソフラボンは大豆に含まれるイソフラボン誘導体の総称で、ゲニステインやダイ

ゼイン等のエストロゲン様活性を有する物質を含んでいる(Hua *et al.*, 2003)。食品に含まれるフィトエストロゲンとして骨粗鬆症や更年期障害に対する効能が期待されている。またエストロゲンの過剰分泌時にはアンタゴニストとして機能し、乳癌や前立腺癌の予防に役立つと考えられている。

(f) タモキシフェン(TAM; 図 2-11)

TAMは乳癌組織などに存在するエストロゲンレセプターに対してエストロゲンと競合的に結合するアンタゴニストである(Jordan *et al.*, 1975)。過剰のエストロゲンが存在する場合に、その働きを抑える機能を有する。CYP2D6 により *N*-脱メチル・ α -水酸化され、CYP3A4 により 4-水酸化を受けて尿中に排泄される。

(g) テガフル(TGF; 図 2-12)

TGF はフルオロウラシルのテトラヒドロフラン誘導体である。肝臓で CYP2A6 による代謝を受け、活性物質であるフルオロウラシルが生成する。フルオロウラシルはウラシルのアナログであり、ピリミジン合成や RNA 合成を阻害することで抗癌活性を示す(Kajitani *et al.*, 1993)。

(h) ワルファリン(WRF; 図 2-13)

WRF は抗凝固剤や殺鼠剤として用いられる薬品である。WRF はビタミン K の作用と拮抗することにより血液凝固因子の生成を妨げることで薬効を発揮する。血液中では 99.5%がアルブミンなどの血漿タンパク質と結合しており、生体内における半減期が約 3 日と長い(Pinkerton *et al.*, 1990)。

(i) チオテパ(TESPA; 図 2-14)

TESPA は CPA と同じくナイトロジェン・マスタード系のアルキル化剤で、DNA をアルキル化することにより抗癌活性を示す。静脈注射で投与され、主に腎臓から排泄される。血液中でタンパク質と結合している割合は 10%と比較的小さく、生体における半減期は約 8h である(Maanen *et al.*, 2000)。

(j) ドセタキセル(DTX; 図 2-15)

DTX はタキサン系の化合物であり、微小管の脱重合を阻害することによって細胞分裂を阻害する。静脈注射で投与され、肝臓で CYP3A4, CYP3A5 により代謝を受けて胆

汁中へ排泄される。血漿タンパク質結合は 98%以上で、半減期は約3日半と長い (Urien *et al.*, 1996)。

2-4 生化学・分析化学実験方法

本研究で使用した、マイクロチップを用いない各種実験方法について詳細を記述する。

2-4-1 HPLC による物質定量

カラムは逆相カラム TSKgel ODS-80T_M 4.6 mm φ× 150 mm (東ソー)を使用した。HPLC は(株)日本分光の製品を使用した。ポンプは PU-1580、検出は UV 検出器により行った。移動相には 10%アセトニトリル溶液を用い、サンプルは 50 μL 導入した。

CPA の分析: CPA 含有培地に 5 倍量の酢酸エチルを加え攪拌の後、4000 rpm で 10 min 遠心し、有機相を回収した。これを窒素ガス気流下で風乾し、そこに 100 μL の milli Q を加えた物を分析した (Busse *et al.*, 1997)。HPLC カラムオーブンは 37°C に設定し、190 nm の紫外吸収を測定した。

2-4-2 蛍光光度法による物質定量

蛍光光度計は LP-6500 (日本分光)を使用した。

WRF は Ex = 320 nm, Em = 380 nm;

フルオレセインイソチアネート標識ウシ血清アルブミン (FITC-BSA) は

Ex = 495 nm, Em = 520 nm;

LY は Ex = 428 nm, Em = 536 nm;

レゾルフィン は Ex = 560 nm, Em = 590 nm にて定量を行った。

2-4-3 SDS-PAGE

低分子タンパク質を分離するため、トレーリングイオンとしてトリシンを使用した。陽極緩衝液 (pH 8.9) に 0.2 M のトリス-HCl を、陰極緩衝液 (pH 8.25) に 0.1 M トリス、0.1 M トリシン、0.1% SDS を使用した。濃縮ゲルは 4% T, 3% C、分離ゲルは 16% T, 3% C のポリアクリルアミドゲルで、泳動は 30V の定電圧で 18 h 行った。泳動後、ゲルを回収しバンドを固定した後、クイック CBB (和光) にて染色を行った。

2-4-4 薄層クロマトグラフィー

マイクロチップから回収した液 500 μl を 5 倍量の酢酸エチルで抽出し、窒素風乾後に 100 μl の酢酸エチルに再溶解させたものを試料として用いた。展開液には 70 %ヘキサン、30 %ジエチルエーテル、1%酢酸の混合液を用い、担体には順相のシリカゲルプレート (Silica gel 60, 1mm; Merck) を用いた。縦横 10 cm のプレートの下から 2 cm の部分に試料をスポットし、1 cm の高さまで満たした展開液により展開を行った。スポットの検出は硫酸噴霧による炭化により行った。展開後のプレートをよく乾燥させた後、50 % (v/v) 硫酸をスプレーにより噴霧し、スポットが褐色を帯びるまで 150 $^{\circ}\text{C}$ で乾熱を行った。

2-4-5 物質透過試験

細胞の物質透過は式 1 によって透過係数 P_c を算出して評価した (Marino, *et al.*, 2005)。

$$P_c = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot S \cdot C_D} \quad (\text{式 1})$$

P_c :物質の透過係数 (cm/sec)、 ΔA :単層を透過した物質の量 (nmol)、 Δt :透過実験を行った時間 (sec)、 S :多孔質膜の面積 (cm^2)、 C_D : apical 側の溶液の初期濃度 (μM) である。

この数式は mL スケールで培地が存在し、添加物質量に対して ΔA が十分に小さい場合にのみ成立する。マイクロチップのような微小空間で透過を行う場合、透過の結果 apical 側と basal 側の濃度差が小さくなり、透過量が C_D に比例しなくなる。これを考慮した場合 (式 1) は以下のようになる。

$$P_c = \frac{\Delta A}{\Delta t \cdot S \cdot (C_A - C_B)} \quad (\text{式 2})$$

C_A : apical 側の溶液の濃度 (μM)、 C_B : basal 側の溶液の濃度 (μM) である。

ここで C_A 、 C_B は Δt sec 後の総透過物質量 A を用いて以下のように書き換えられる。

$$C_A = \frac{T-A}{S \cdot h_A} \text{ (式 3)} \quad C_B = \frac{A}{S \cdot h_B} \text{ (式 4)} \quad T = C_D \cdot S \cdot h_A \text{ (式 5)}$$

h_A : apical 側の溶液の高さ (cm)、 h_B : basal 側の溶液の高さ (cm)、 T : 初期添加物質量 (nmol) である。

また、 A の初期値 A_0 及び最終値 A_∞ は以下の通りである。

$$A_0 = 0 \text{ (式 6)} \quad A_\infty = \frac{h_B}{h_A+h_B} T \text{ (式 7)}$$

これらの条件から A の算出式は以下のように求まる。

$$A = \frac{h_B \cdot T}{h_A + h_B} \left(1 - e^{-\frac{Pc \cdot (h_A + h_B)}{h_A \cdot h_B} t} \right) \text{ (式 8)}$$

マイクロチップを用いた透過性試験ではこの式を用いて透過係数を算出した。

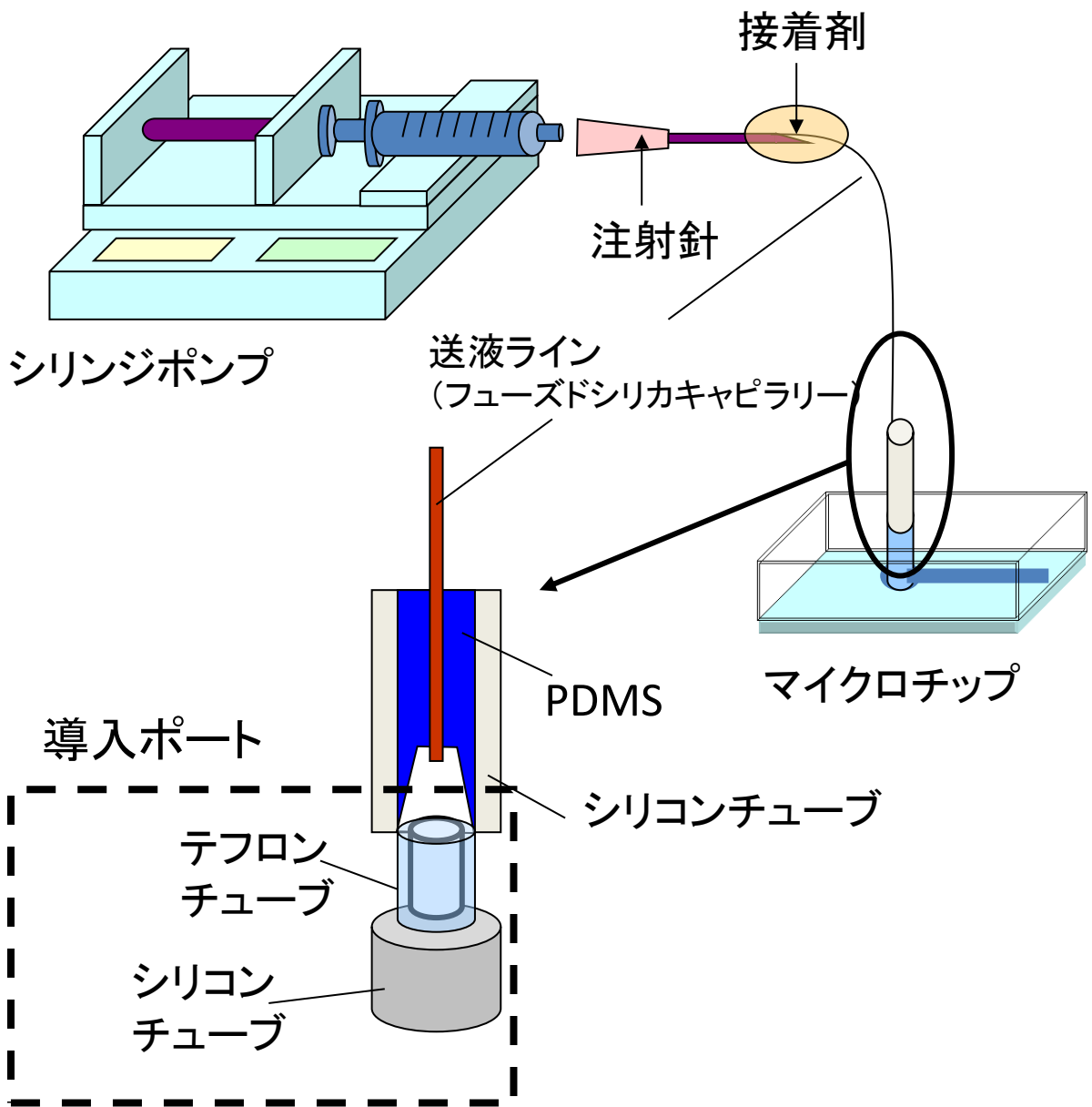


図2-1マイクロチップシステム概要図

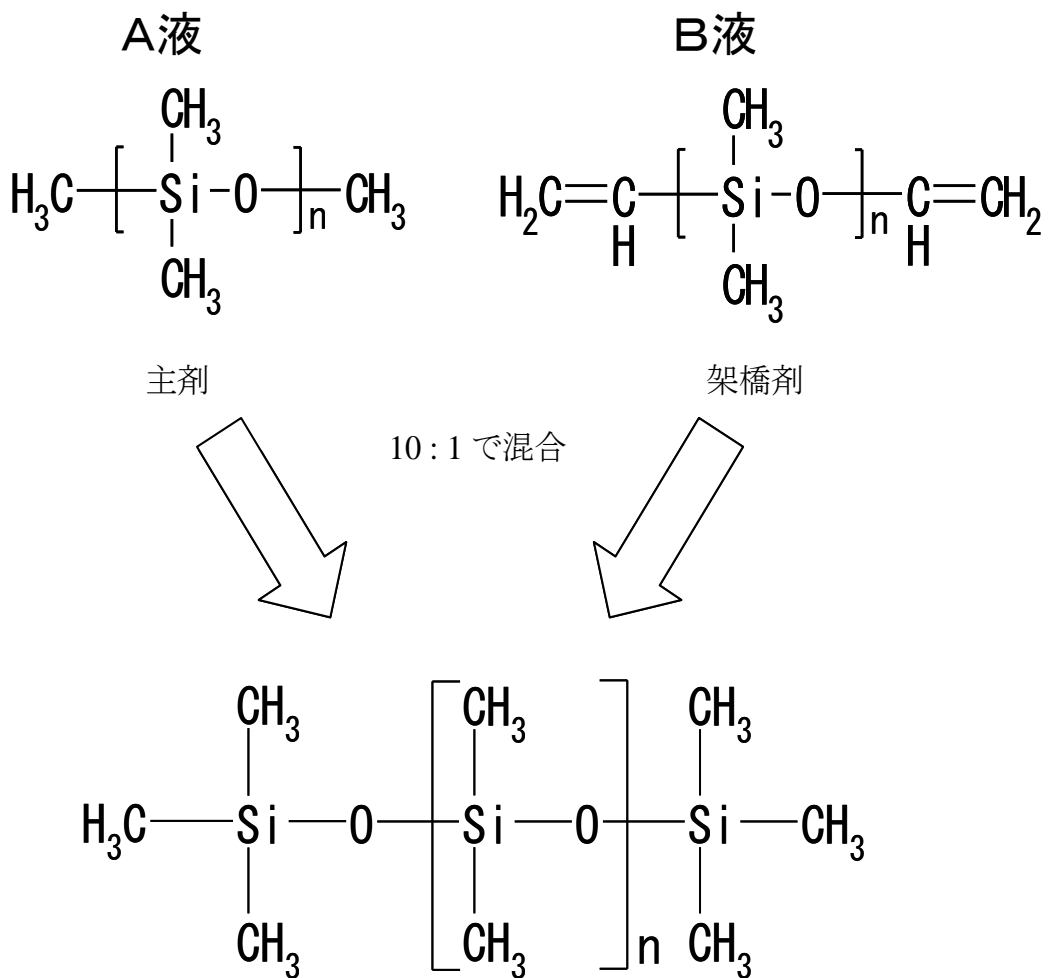


図2-2. ポリジメチルシロキサン(PDMS)

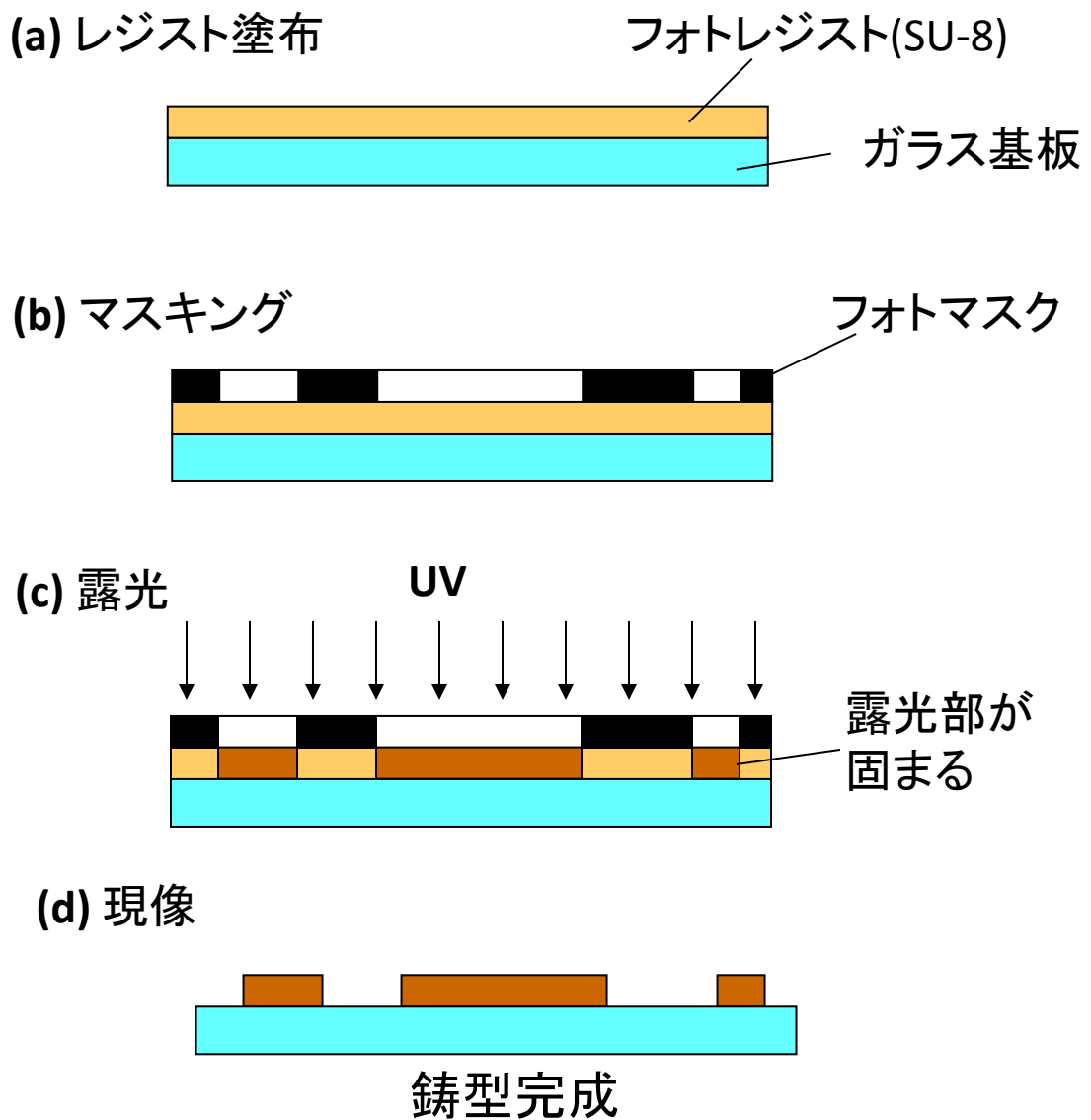
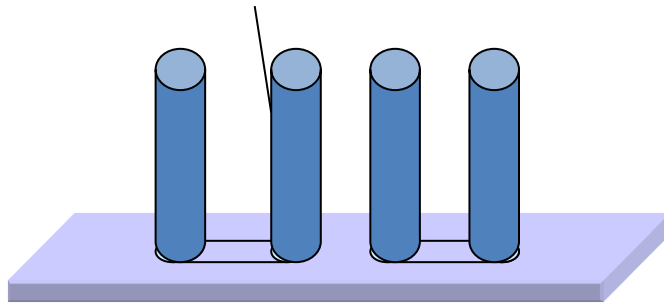


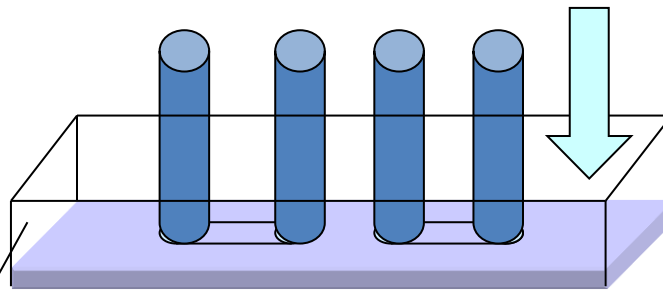
図2-3 鋳型作製の概略図

A テフロンチューブ
(試料導入用)



鋳型

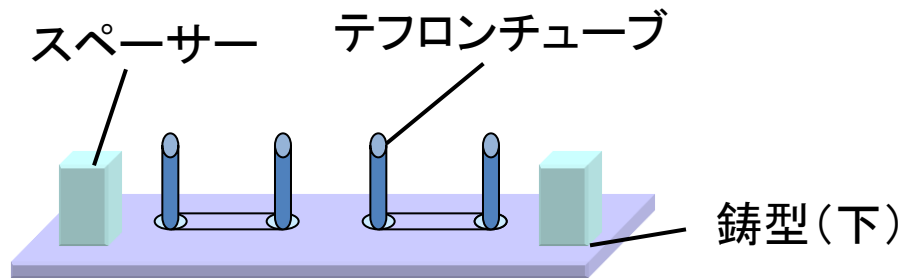
PDMS



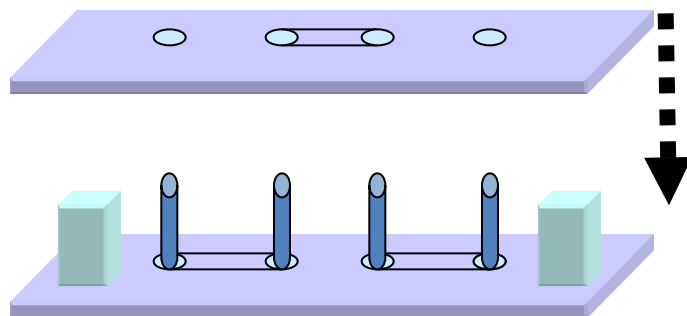
透明粘着テープで四辺を囲み、枠を作製
枠の中にPDMSポリマーを流し込む

図2-4-A. 上層PDMSシートの作製法

B (a) スペースおよびテフロンチューブを配置



(b) 鋳型(上)の接着



(c) PDMS注入

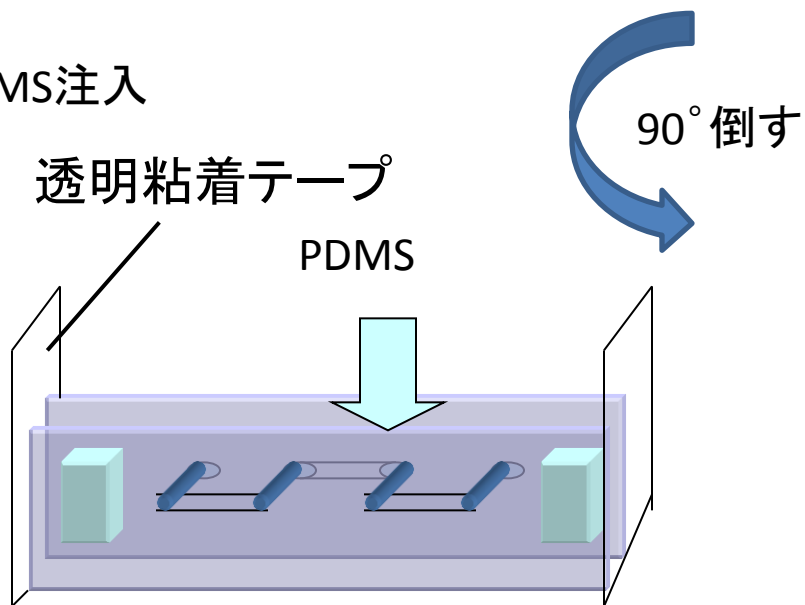
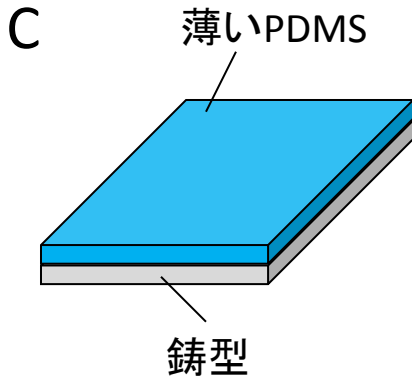
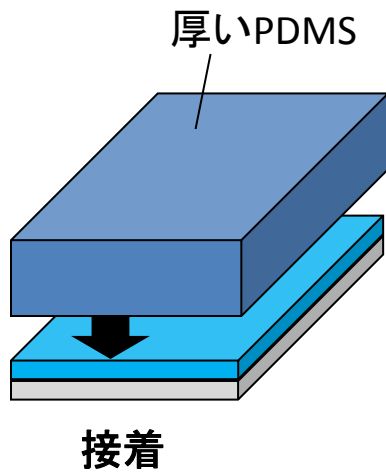


図2-4-B. 中層PDMSシートの作製法

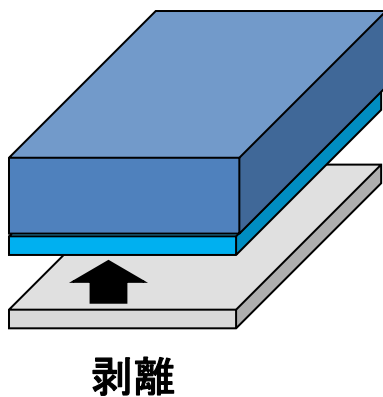
C



- ・鋳型にPDMSを塗布
- ・スピンドーターで回転
⇒薄い厚さで均一化
- ・鋳型ごと加熱



- ・上板となる厚いPDMSシートを別途用意
- ・PDMSを乗せた鋳型と上板をプラズマに照射して接着



- ・PDMS薄膜ごと鋳型から剥離

図2-4-C. 薄層PDMSシートの作製方法

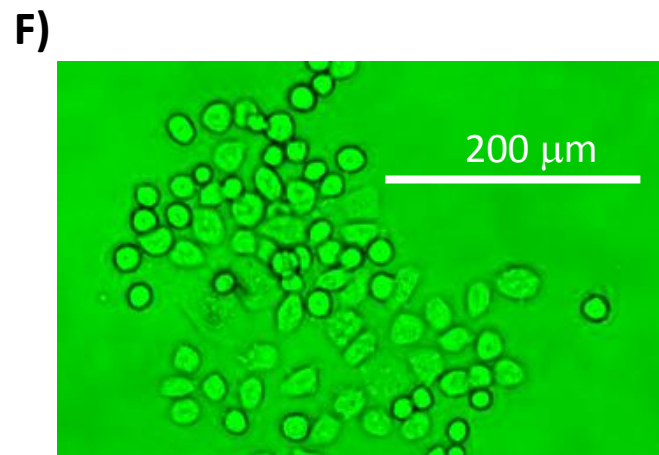
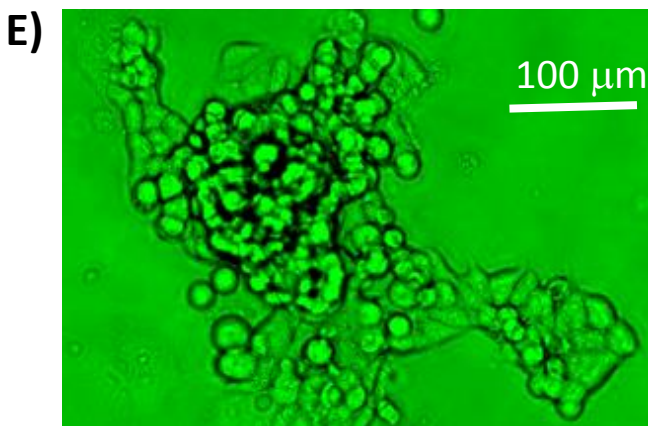
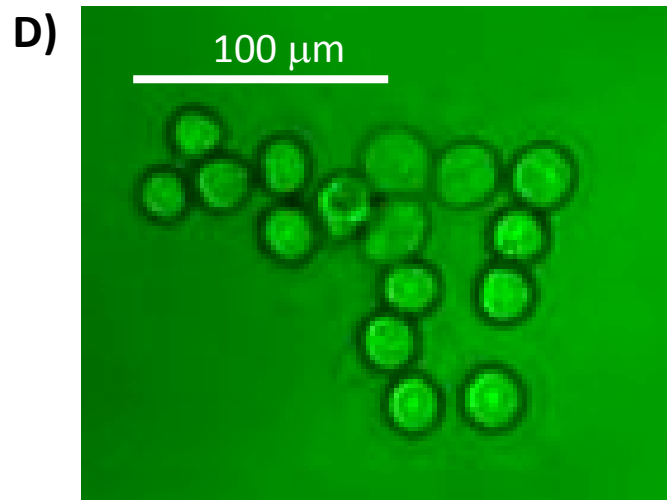
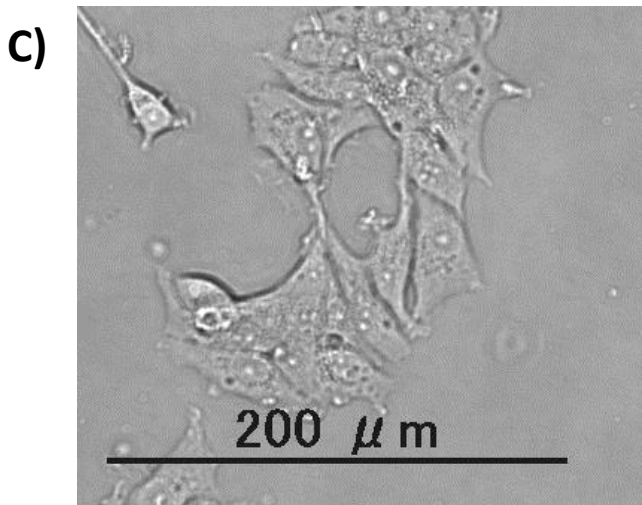
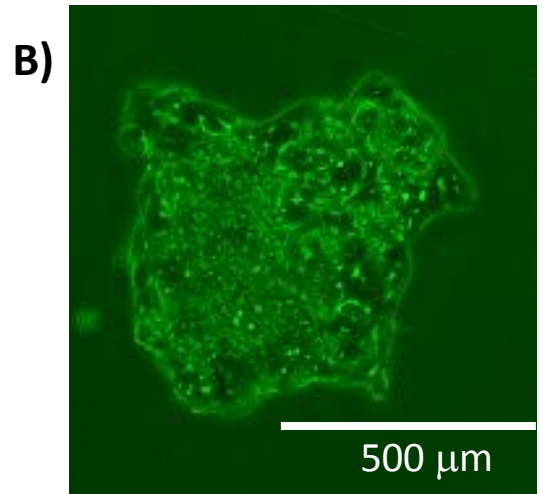
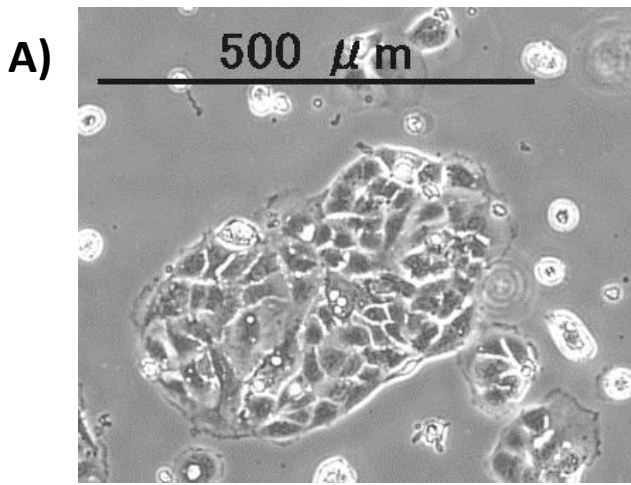


図2-5. 培養細胞の写真

A) Caco-2細胞

B) HepG2細胞

C) MCF-7細胞

D) MDA-MB-453細胞

E) ZR-75-1細胞

F) SK-BR-3細胞

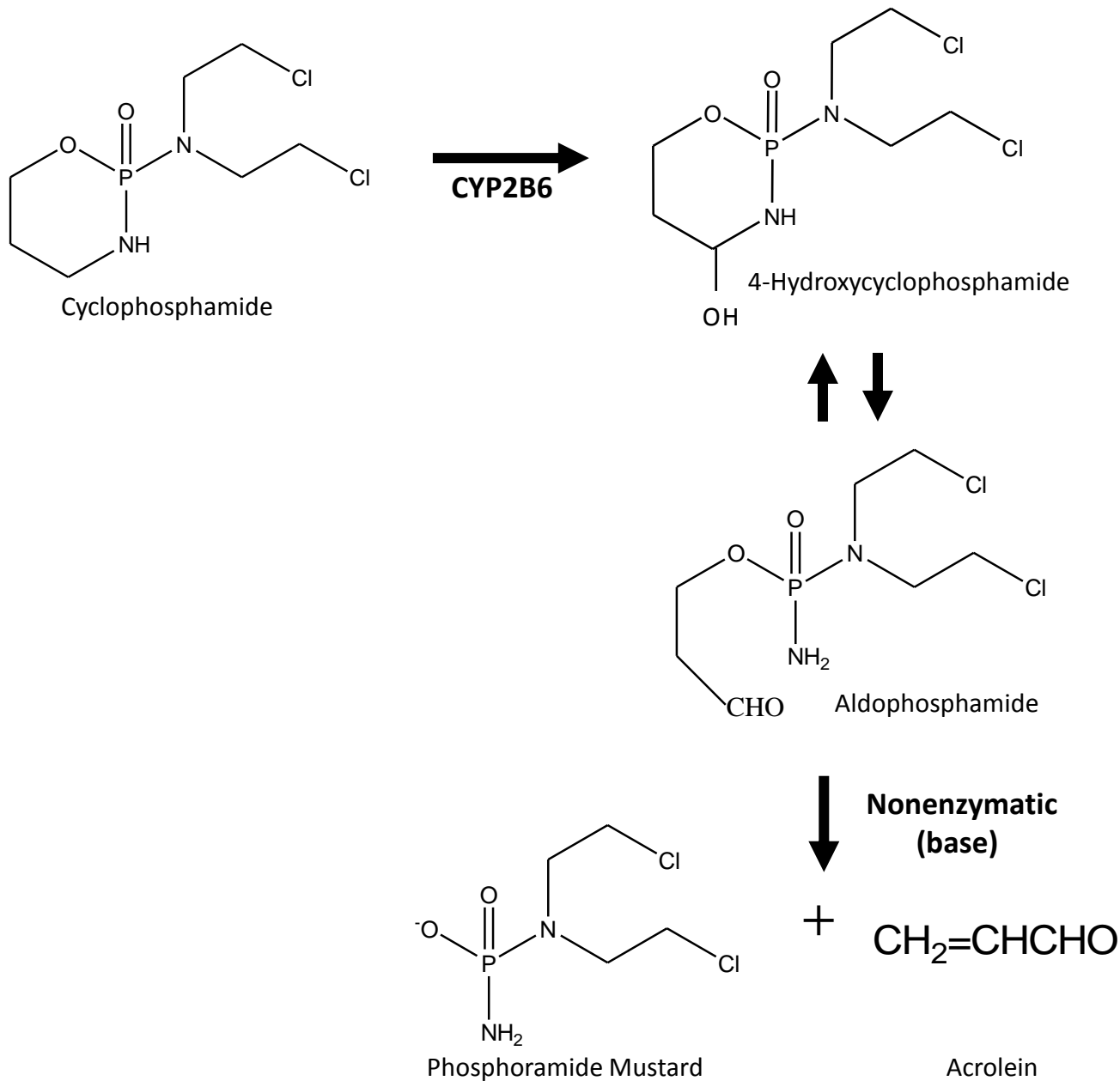


図2-6. CPAの代謝経路

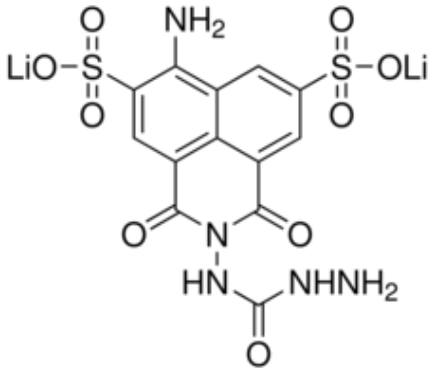


図2-7. LYの構造

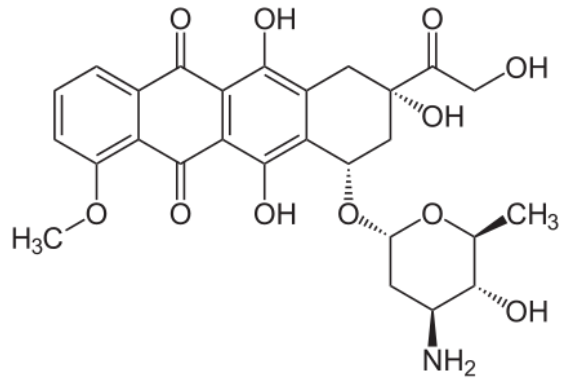


図2-8. EPIの構造

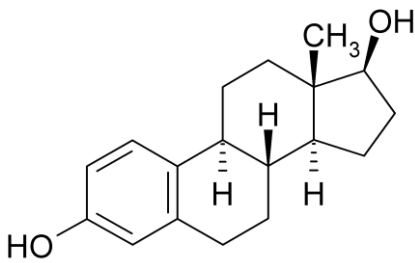


図2-9. E2の構造

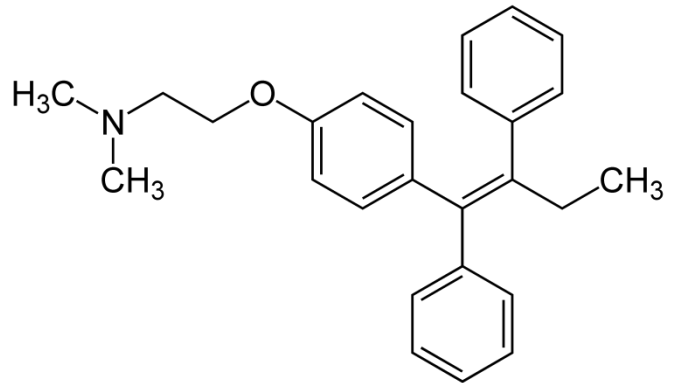


図2-11. TAMの構造

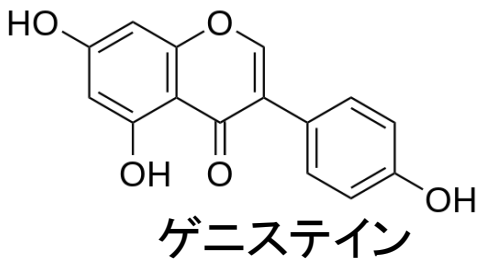


図2-10. IFの構造

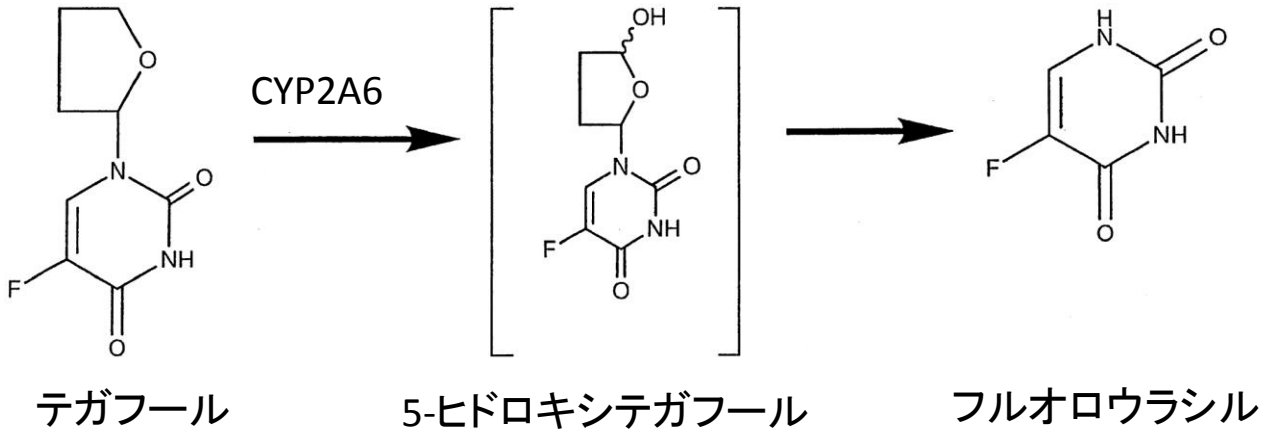


図2-12. TGFの代謝経路

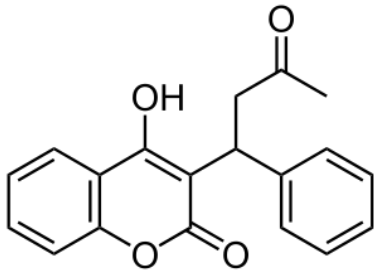


図2-13. WRFの構造

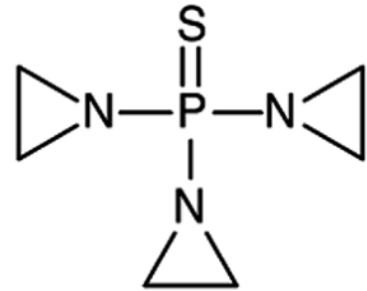


図2-14. TESPの構造

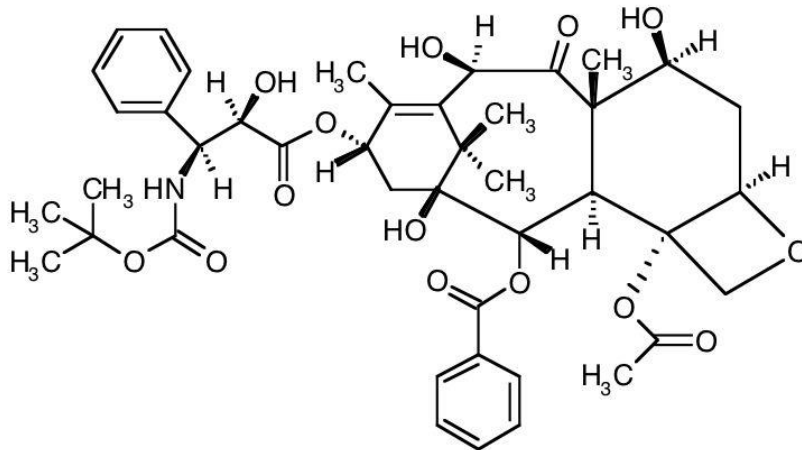


図2-15. DTXの構造

表2-1 鋳型およびPDMSシート作製の諸条件

高さ	SU-8	回転数	プレベイク	露光	ポストベイク	現像
15 μm	2015	3000 rpm	5 min	60 s	5 min	7 s
30 μm	2015	1500 rpm	5 min	60 s	5 min	7 s
50 μm	2035	3000 rpm	8 min	180 s	10 min	15 s
100 μm	2035	2000 rpm	8 min	180 s	10 min	15 s
150 μm	2100	2000 rpm	15 min	300 s	15 min	60 s
200 μm	2100	1500 rpm	15 min	300 s	15 min	60 s

PDMSの厚さ	加熱温度	加熱時間
50 mm	95°C	1 min
100 mm	95°C	2 min
150 mm	95°C	2 min
3 mm	70°C	40 min

95°Cの加熱はホットプレートで、
70°Cの加熱は乾熱機を用いて行った

3章 マイクロチップの操作および細胞培養

緒言

本章では 2 章で作製したマイクロチップを用いて実験を行うための諸技術を確立した。本研究では、細胞の用途によって適したマイクロチップ内培養法を確立する必要がある。バイオアッセイの標的として使用する乳癌細胞や模擬肝部位で使用する HepG2 細胞は、チップ内で培養することによるストレスにも耐えられるように培養しなければならない。模擬腸上皮部位で使用する Caco-2 細胞は、培養支持膜上でシングルレイヤーを形成するように培養する必要がある。

また、細胞培養環境のみならず、培地をマイクロチップへ送液する方法なども構築する必要がある。細胞培養マイクロチップに頻用されるのはマイクロシリンジポンプを用いた外部からの送液であり、本研究でもこれを採用した。しかし本研究ではそれに加えてチップ内で培地を循環させるシステムを作製するため、チップ搭載型の小型ポンプの開発を行った。チップ搭載型ポンプには2種類が報告されており、ひとつは小型スターラーを用いて循環させる方法である。しかしこの方法はマイクロチップにしては大規模な流路が必要で、流速が設定しにくいなどの欠点がある。もうひとつはペリスタルティックポンプの要領で流路を蠕動させることにより溶液駆動を生み出す方法である。本研究ではこちらを採用することとした。

3-1 マイクロチップの操作

3-1-1 操作環境

マイクロチップ内部で細胞を培養する際、細胞を乾燥とコンタミネーションから守る必要がある。そのためマイクロチップの滅菌を行い、無菌的で保湿可能な環境を整えた。細胞導入前のマイクロチップはクリーンベンチ内に 3 h 静置し、紫外線により滅菌を行った。無菌状態を維持しながら乾燥を防ぐため、細胞培養中のチップを図 3-1 に示すようなプラスチックの箱に保管しながら CO₂ インキュベーター内で培養した。箱はマイクロピペットのチップケースを改良したもので、底部に殺菌消毒液ヒビテン(大日本住友製薬株式会社)の希釈液を添加することにより、コンタミネーションと乾燥を防ぐことに成功した。

3-1-2 マイクロチップ内への細胞導入

培養細胞は 6 cm ディッシュで継代培養を行った。細胞が 70%コンフルエントになったときトリプシンによる処理を行い、ディッシュより剥離した。そこにバイオアッセイ用に調製した培地(DMEM + 10% FBS + 1% NEAA + 抗生物質)を加え、細胞濃度を 1×10^5 – 1×10^7 cells/mL に調製した。懸濁液を Gel-Saver ピペットチップを用いてマイクロチップの導入ポートより導入した。目的とするチャンバー以外に通じる導入ポートを栓で密封することで、目的の部位だけに細胞懸濁液を導入することを可能とした (図 3-2)。培地交換も同様の手順にて行った。

3-1-3 マイクロチップへの送液

外部からの力を用いてマイクロチップ内で液体を流動させる流体制御方法として、ポンプの圧力によって駆動するシステムを使用した。脈流を抑え、微流量を制御できるものとしてマイクロシリンジポンプ (KDS210, KD scientific, USA) を使用した (Tokeshi, *et al.*, 2002, Odake, *et al.*, 2001)。シリンジとしてテルモシリンジを用いた。シリンジからマイクロチップまでの配管はフューズドシリカキャピラリー (*i.d.*=0.1 mm, *o.d.*=0.2 mm; GL sciences) を使用した。シリンジ側先端は 24G の注射針(テルモ)に接着剤でキャピラリーを固定し、マイクロチップ側の先端にはマイクロチップ接続用のシリコンチューブ (*i.d.*=2 mm, *o.d.*=4 mm; アズワン) を接着した。接着および固定には、細胞毒性の低い接着剤であるアラルダイト(バンティコ)を用いた。

フューズドシリカキャピラリーにて培地を送液する際に発生する気泡をマイクロチップ内へ運び入れないため、気泡トラップを設けた。概要を図 3-3 に示す。2つの小さなシリコンチューブ(小チューブ, *i.d.*=2 mm, *o.d.*=4 mm, 高さ=8 mm)と1つの大きなシリコンチューブ(大チューブ, *i.d.*=4 mm, *o.d.*=7 mm, 高さ=16 mm)からなり、それらをアラルダイトで固定してある。大チューブの内部に 8 mm 程度の適当な間隙を保ちつつその両端に小チューブを差し込んでいる。マイクロチップとキャピラリーの間にこのトラップを挟みこむと、キャピラリーで発生した気泡がシリコンチューブ内にたまり、マイクロチップ内部へ入り込むことを防ぐことができた。

3-1-4 マイクロチップ観察装置

細胞を用いたバイオアッセイの評価法として、本研究では細胞の直接観察および蛍光染色観察を行った。直接観察を行うには PDMS マイクロチップを通して細胞の顕微鏡観察を行うための顕微鏡が必要となる。マイクロチップ上面は導入ポートや送液ラインなどが存在するため底面から観察を行える位相差倒立顕微鏡が望ましい。また、蛍光染色観察をするために、蛍光物質に応じた波長での検出が必要となる。

本研究ではこれらの要件を満たすものとして、倒立型蛍光顕微鏡を使用することとした (Zhang, *et al.*, 1998)。蛍光顕微鏡は水銀ランプの高輝度光を光源として用い、蛍光ミラーユニットにより光のフィルタリングを行うことで、励起光・蛍光を同軸上で扱うことのできるシステムである (図 3-4)。励起光は試料近傍から対物レンズによって絞り込まれ、蛍光は集光されるため、効率的で空間分解能の高い蛍光検出が可能となる。本研究では蛍光顕微鏡として倒立顕微鏡 Olympus IX71 を使用し、記録には冷却 CCD カメラ DP30BW (オリンパス) を用いた。

3-2 マイクロポンプ

マイクロポンプには Unger らによって報告された、溶液流路上方に制御用流路を設置する方法を用いた (Unger *et al*, 2000)。図 3-7 に溶液駆動の概要を示す。溶液流路に液体を充填する。制御用流路に空気を送り込み、流路内を陽圧にして膨張させる。溶液流路と制御用流路の間にある PDMS が押し下げられる。溶液流路側から見れば天井が押し下げられる形となり、その両傍で流動が生ずる。また、制御用流路への加圧を止めて制御用流路を大気圧へ戻すことで、陽圧だった制御用流路は元の大きさへ戻ろうとする。溶液流路の側から見れば降りていた天井が戻り、両傍で先ほどとは逆方向の流動が生ずる。この押し下げ・戻しのステップを複数の制御用流路にてそれぞれ制御することにより、一方向への流動を生じさせた。

方法

3-2-1 マイクロポンプの設計

マイクロポンプは4本の制御用流路と循環型の溶液流路からなる。制御チャンネルの寸法は(流路幅, 流路高)= 0.2 mm, 0.15 mmとし、溶液流路は流路幅を0.2 mmとして複数の流路高条件で検討を行った。上層シートの下面に制御用流路を造型し、薄層シートの下面に溶液流路を造型した(図 3-5)。

3-2-2 マイクロチップ内への送気方法と制御

各制御用流路への空気の加圧は電磁弁をパソコンで制御することによって行った。加圧源には圧縮空気を 0.02 MPa で用い、これをポリウレタンチューブで 4 連ソレノイドバルブ (V100 シリーズ; SMC) に接続して 4 分岐し、各制御用流路に接続した。ソレノイドバルブはデジタルスイッチ NI9477 (National Instruments) および NI cDAQ-9172 (National Instruments) を介してパソコンに USB 接続し、Lab View (National Instruments) によってプログラムを作成して制御した(図 3-6)。

以下にその具体的な手法を述べる。制御用流路を一定の間隔を空けて4本設置し、溶液流路の上流から下流へ向けてそれぞれ制御用流路 a から d と名づけた。

第一ステップで制御用流路 a を陽圧にし、両側へ流動を生じさせる。

第二ステップで制御用流路 b を陽圧にし、下流側へ流動を生じさせる。この際制御

用流路 a は降りているため、上流方向への流動は塞き止められて生じない。

第三ステップで制御用流路 c を陽圧にし、下流側へ流動を生じさせる。この際制御用流路 b は降りているため、上流方向への流動は塞き止められて生じない。これと同時に制御用流路 a を大気圧へ戻す。これにより制御用流路 a が元の大きさに戻り、上流側から溶液が流入する。

第四ステップで制御用流路 d を陽圧にし、下流側へ流動を生じさせる。この際制御用流路 c は降りているため、上流方向への流動は塞き止められて生じない。これと同時に制御用流路 b を大気圧へ戻す。これにより制御用流路 b が元の大きさに戻り、上流側から溶液が流入する。

第五ステップで制御用流路 c を大気圧へ戻す。直後に制御用流路 d も大気圧へ戻す。これらにより上流からの溶液流入が生じる。

以下、第一ステップから第五ステップを繰り返すことにより一方向への流動を発生させた(図 3-7)。

3-2-3 マイクロポンプの駆動

溶液流路に 1 mg/mL アルブミン溶液を満たし、室温で 2 h 放置して流路表面の PDMS をアルブミンでコートした。制御流路にソレノイドバルブを接続し、ポンプの駆動を行った。溶液の流れを可視化して観察するため、1 μm 径の蛍光ビーズ(ex = 441 nm, em = 486 nm; polysciences)を 1×10^7 particles/mL となるよう添加した。ビーズの流動は蛍光顕微鏡を用いて観察した。

結果と考察

3-2-4 蛍光ビーズによる溶液フローの観察

蛍光ビーズの動きを観察した結果、脈流となりながら一方向へ動いている様子が確認された(図 3-8)。溶液流路の高さを変えながら適当なビーズの速度を測定し、流速を求めた。その結果は表 3-1 となった。溶液流路の高さを高くしても線流速はほぼ一定の値を示し、溶液流路の高さと流速はほぼ比例した。このことから 100 μm までの溶液流路高に関しては損失が比較的少ない送液が実現できたと考えられる。

3-3 マイクロチップ内での細胞培養

方法

3-3-1 水平流路内での接着細胞培養

細胞接着用試薬として頻用されるフィブロネクチンを用いて培養チャンバーのスライドガラス表面を修飾して細胞を培養した。フィブロネクチン(旭テクノグラス)を Dulbecco's Phosphate buffer (PBS: SIGMA) で濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。コーティング条件は温度 37°C で 2 h である。修飾後、培地によりチャンバーを洗浄した後に 1×10^5 cells/mL の細胞懸濁液の導入を行った。培養チャンバー内で一晩培養することで細胞の接着を行った。翌日に培地交換をすることで接着しなかった細胞を除去した。

3-3-2 マイクロキャリアービーズ表面での接着細胞培養

細胞培養用マイクロキャリアービーズ上に細胞をあらかじめ培養し、マイクロチップ内へ導入した。この方法はマイクロチップ内で増殖させることが難しい細胞を、チップ内へ大量導入するのに適している。細胞培養用マイクロキャリアービーズには Cytodex 3 ($d=176 \mu\text{m}$, ; GE Healthcare) を用いた。

Cytodex 1g あたり 100 mL の PBS に室温で 3 h 浸し、Cytodex を膨潤させた。上清を取り除き、新しい PBS を 50 mL/g Cytodex で加え、数分間洗浄した。PBS を取り除き、新しい PBS を 50 mL/g Cytodex で加え、オートクレーブ (115°C, 15 min) により滅菌を行った。PBS を取り除き、50 mL/g Cytodex となるよう培地を加えた。この懸濁液を 5 mL ずつ直径 60 mm のシャーレに分注を行い、 1×10^5 個の細胞を加え、温度 37°C、湿度 100 %、CO₂ 濃度 5 % で培養を行った。

Cytodex はゲルセイバーを用いた導入が難しかったため、Cytodex 導入用のデバイスを作製した。概要は図 3-9 の通りである。1.5 mL のマイクロチューブの底を 5 mm 程度削り抜き、空いた穴にシリコンチューブ (*i.d.* 2 mm; *o.d.* 4 mm; 高さ 8 mm) を接着剤で固定した。その一方でマイクロチューブの蓋に 19G の注射針 (テルモ) を突き刺し、接着剤で固定した。この導入デバイスを目的とする流路の上部にあるポートに設置し、チューブ内部に Cytodex 懸濁液を充填した。Cytodex が目的としない流路へ漏洩しないよう、流路に隣接するポート以外のポートを全てキャップした。マイクロチューブの蓋を閉じ、注射針にシリンジを接続し、空気を送り込んだ。これによりチューブ内部を陽圧にし、Cytodex 懸濁液を流路へ導入した。

3-3-3 培養支持膜上での接着細胞培養

2-1-6 の培養支持膜上にコンフルエントな細胞レイヤーを作製した。 1×10^7 cells/mL の細胞懸濁液を導入後、一晚培養することで培養支持膜に細胞を接着させた。24 h 後、接着しなかった細胞を培地交換することで取り除いた。24 h おきに培地を交換しながら 3 d 間培養した。

3-3-4 マイクロチップ内での生存細胞数測定法

マイクロチップ内で細胞の生死を簡便に測定するため、レサズリン (Cell Titer Blue ; Promega) 代謝により生存細胞数を定量化した。レサズリンは細胞内で様々な還元酵素により蛍光物質であるレゾルフィン ($\lambda_{\text{ex}} = 560 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$) に還元され、周囲の培地に放出される (O'Brien *et al.*, 2000)

細胞の培養液を 20% の Cell Titer Blue を含む培地で置換し、1 h のインキュベーションを行った。その後蛍光顕微鏡 (上限フィルタ 510 nm, 下限フィルタ 590 nm, ダイクロイックミラー 570 nm) を用い、輝度によりレゾルフィンを定量した。

このレサズリン法により、アッセイ前とアッセイ後の細胞数をそれぞれ測定し、その比率により生理活性を評価した。この比率を以下、生存比と呼ぶ。生存比を百分率にし、100 を引いた値を増殖率 y と呼ぶ。

$$y = \left(\frac{(\text{アッセイ後の細胞数})}{(\text{アッセイ前の細胞数})} - 1 \right) \times 100$$

y は初期細胞数に対してどれだけ細胞増殖が増減したのかを示す数値であり、負の数の場合は細胞が減少したことを表す。

結果と考察

3-3-5 水平流路内での接着細胞培養

HepG2 細胞、MCF-7 細胞、MDA-MB-453 細胞、ZR-75-1 細胞、SK-BR-3 細胞を水平流路で 1 d 培養し、接着した細胞の数を図 3-10 に示す。水平流路をフィブロネクチンで修飾しなかった場合は、全ての細胞で接着状態が良くなかった。接着した細胞の数もロットにより大きく変化し、再現良い接着を行うことができなかった。一方、フィブロネクチンでスライドガラス表面を修飾した場合は、SK-BR-3 細胞を除いて良く接着していた。SK-BR-3 細胞は通常のディッシュで培養している場合にも接着が強くない傾向があった (data not shown) ため、マイクロチップを用いたバイオアッセイシステムで使用するには不向きだと考えられる。

これらの細胞に対して、0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ の培地を送液しながら 2 d の培養を行った後の増殖率を図 3-11 に示す。MCF-7 細胞は 67% 程度の増殖を示した。通常の培養ディッシュを用いた培養条件では MCF-7 細胞は 20 h 程度で倍加するが、マイクロチップ内での培養では培地が少なく、剪断応力ストレスなどに晒されるため、通常よりも増殖が抑えられていると考えられる。また、MCF-7 細胞以外の種類の細胞は 2 d の培養の間に細胞数が減少した。これらの細胞は MCF-7 細胞よりも接着力が弱く、培地のフローにより流されてしまったのだと考えられる。

ストレスの主な原因を調べるため、流速を変化させて同様の実験を行った。結果を図 3-12 に示す。流速が速ければ培地の供給スピードが上がるため、栄養枯渇のリスクは減少する。しかしその反面で剪断応力ストレスは大きくなる。流速が遅い場合は培養環境がマイルドながらも、栄養枯渇の可能性が上昇する。HepG2 細胞は流速が速い場合に生存比が小さいことから、培地のフローによるストレスがより影響していたと考えられる。一方他の乳癌細胞には大きな影響がなく、これらはマイクロチップ内での培養に適していないと考えられる。なお、カルセイン AM による染色やレサズリンの導入などの実験操作を接着させた細胞に対して数回繰り返し行ったところ、生存細胞数や細胞の状態に対して大きな変化は生じなかった。このことから測定実験操作による細胞生育に対する影響はないと考えられる。

これらの結果から標的部位の乳癌細胞として MCF-7 細胞を用い、水平流路をフィブロネクチンでコートしたチャンバーにて培養することとした。HepG2 細胞に関してはフローストレスを軽減することが解決策となる。しかし流速を減速した場合は、直列に配置された各アッセイパートにおいても影響が生じる。そのため他の部位で低流速による栄養枯渇が問題となる可能性が考えられる。流速を変えずにフローストレスを低減する方法として、流路の断面積を大きくする方法が考えられる。しかし流路高を増加させると単位体積あたりの細胞数が減少するため、希釈されて肝機能のモデルとして十分

な代謝能を実現させられない可能性がある。流路高を変化させず、流路幅を広く確保することで線流速を遅くすることは可能である。しかし流路幅は 3.0 mm よりも大きくなると天井部分の PDMS が自重によって垂れ下がり、スライドガラスと接着してしまうなどの失敗が生じた。このため、HepG2 細胞に関してはスライドガラス上での培養以外の手段を検討することとした。

3-3-6 マイクロキャリアービーズ表面での接着細胞培養

HepG2 細胞は水平流路での培養を行うと生存数が減少する傾向が観察されたため、Cytodex を用いた培養を試みた。HepG2 細胞は Cytodex 上で 5 d 培養を行った後にマイクロチップへ充填した。検討した充填方法を図 3-13 に示す。0.2 × 4 × 1.5 mm ($H \times L \times W$) の水平流路、直径 1.6 mm の垂直流路、直径 3.2 mm の垂直流路に Cytodex をそれぞれ充填した。

HepG2 細胞を培養した Cytodex を水平流路に充填した場合、直径 1.6 mm の垂直流路に充填した場合、直径 3.2 mm の垂直流路に充填した場合で、マイクロチップ内で 2 d 培養した。培地の流速は 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ とした。培養前と後のレサズリン代謝能を図 3-14 に示す。レサズリンを 20% 含む培地を 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液し、得られた液を蛍光光度計で定量することにより生細胞数を測定した。蛍光光度計でレゾルフィンの蛍光を測定する本法でも、導入細胞数と蛍光強度は比例した (data not shown)。水平流路に Cytodex を充填した場合、HepG2 細胞の生存が小さかっただけでなく、流路に残っている Cytodex が減少していた。これは充填した Cytodex を水平流路内に保持するための仕掛け(網や突起など)を設置していなかったことが原因となり、流路内の Cytodex が培地のフローにより流失したものと考えられる。垂直流路に導入すると Cytodex 同士が重なり合うことで抵抗が発生し、Cytodex の流出は防ぐことができると考えられる。しかし 1.6 mm 径の流路では安定して導入できる Cytodex の数が小さいようで、高いレサズリン還元活性を得ることはできなかった。流路径を 2 倍にした 3.2 mm 径の流路に Cytodex を導入したところ、高い活性を得ることができ、培養後の生存状況も良好であった。これにより HepG2 細胞をチップ内で培養する際には Cytodex 表面に細胞を培養し、アッセイ直前に 3.2 mm 径の垂直流路へ充填する方法を用いた。

また、水平流路において培養が困難であった MDA-MB453 細胞、ZR-75-1 細胞、SK-BR-3 細胞についても Cytodex を利用した培養を応用した。乳癌細胞は Cytodex 上で 2 d 培養してからマイクロチップへ導入した。充填箇所は直径 3.2 mm の垂直流路とした。

0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ の速度で培地を流しながら 2 d 培養した乳癌細胞の増殖率を図 3-15 に示す。水平流路で培養した場合は MDA-MB453 細胞、ZR-75-1 細胞は 2 d の培養で細胞数が初期値より減少しており、SK-BR-3 細胞は 2 d の培養時間に達する前に全細

胞が流れ出てしまった(実質的に死亡率 100%)。しかし Cytodex を利用した方法では全細胞がチップの中で増殖を示した。

径の大きな垂直流路に Cytodex を充填する方法は、フローのストレスを低減するだけでなく、チャンバーにおける培地の量を増やすことに繋がる。そのため水平流路で培養する場合よりも細胞の増殖が増加したものと考えられる。このように生育のあまりよくない細胞をマイクロチップ内で培養する場合、Cytodex を用いる方法が有用だと考えられる。しかし本研究で開発を行うバイオアッセイシステムでは、標的細胞を水平流路に培養する方法(3-4-1)が望ましい。フィブロネクチンによる流路修飾は Cytodex を用いた培養よりも操作が簡便である。また、水平流路ではレサズリンを用いた生細胞測定が蛍光顕微鏡を用いてオンサイトで行うことができるのに対し、垂直流路に Cytodex を充填すると顕微鏡による測定ができなくなる。垂直流路は 3 mm の高さがあり、細胞がその長さに渡って培養されている状態である。蛍光顕微鏡はマイクロチップ下面から励起光を当てるため、垂直流路の奥まで十分に励起光が行き渡らず、蛍光も下面付近のものが中心となる。それゆえ細胞濃度が流路内で均一でなく偏りがあった場合に大きな影響が出てしまい、流路内の細胞数を測定することはできない。そこで本節においてはマイクロシリンジポンプでレサズリン含有培地を送液して、代謝産物をマイクロチップから回収してチップ外部で測定する方法を用いた。この方法は十分に実践的ながらも、オンチップで簡便な分析ができるというマイクロチップの利点を活かしていない。今後の研究で水平流路に接着しづらい細胞を用いる場合本法は有用だと考えられるが、4章以降のバイオアッセイチップにおいては MCF-7 細胞を水平流路で培養して利用する方法を用いた。

3-3-7 培養支持膜上での接着細胞培養

マイクロチップ内で Caco-2 細胞を培養支持膜表面で培養した結果を図 3-16 に示す。流路高を SU-8 2100 の標準的な厚みである 200 μm にして培養を行ったところ、コンフルエントな細胞のシートを得ることはできなかった。細胞シートを隔てた物質透過を評価するためには細胞シートに間隙があつてはそこを通して非選択的な透過が生じる。細胞シートがコンフルエントにならない理由は培地量が少ないことがストレスを与え、シートを構成する細胞が死滅してしまったことが原因だと考えた。そこでチップ内でも比較的多量の培地を確保できるよう、培養流路の高さを 1 mm まで上げた。この条件下ではコンフルエントな細胞シートを得ることができた。4章以降にて詳述する模擬腸上皮部位は 1 mm 高の流路にて作製することとした。

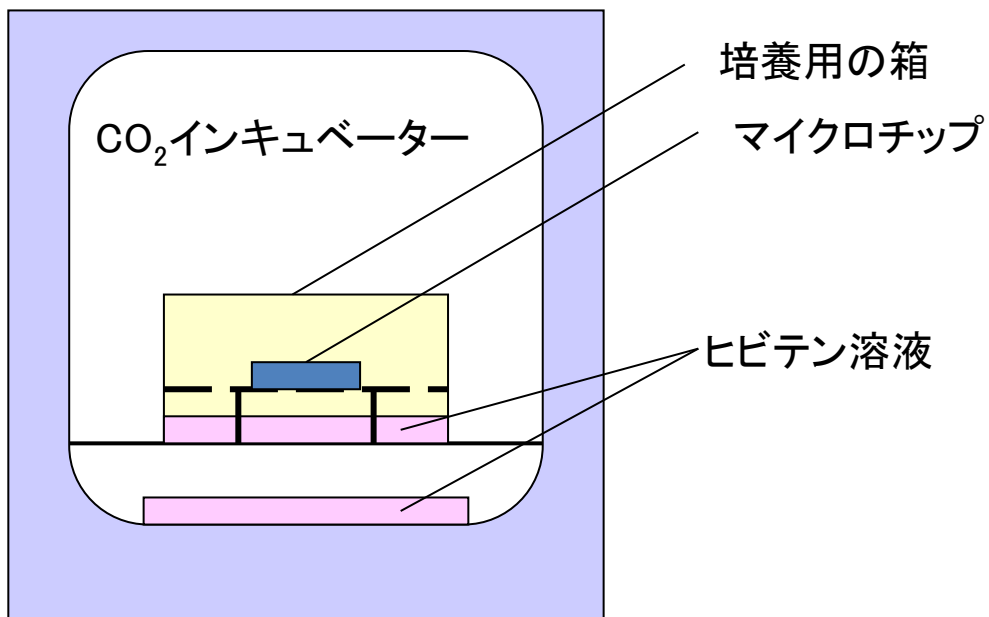


図3-1. 培養箱模式図

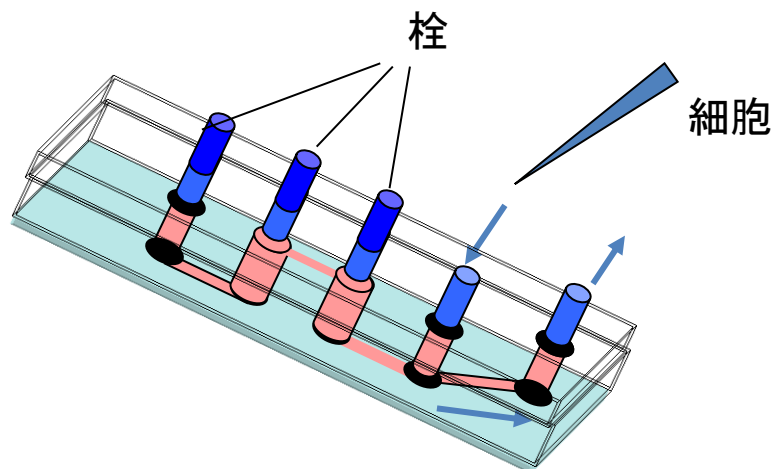


図3-2. 細胞導入方法模式図

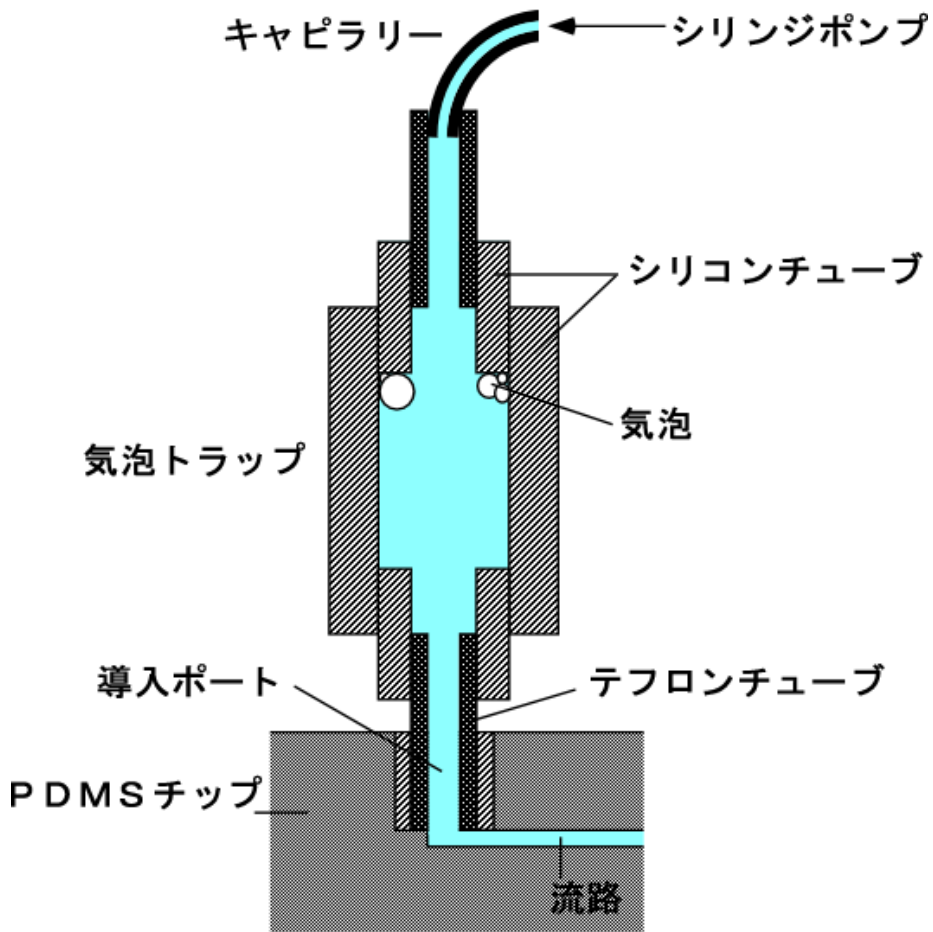


図3-3. 気泡トラップ模式図

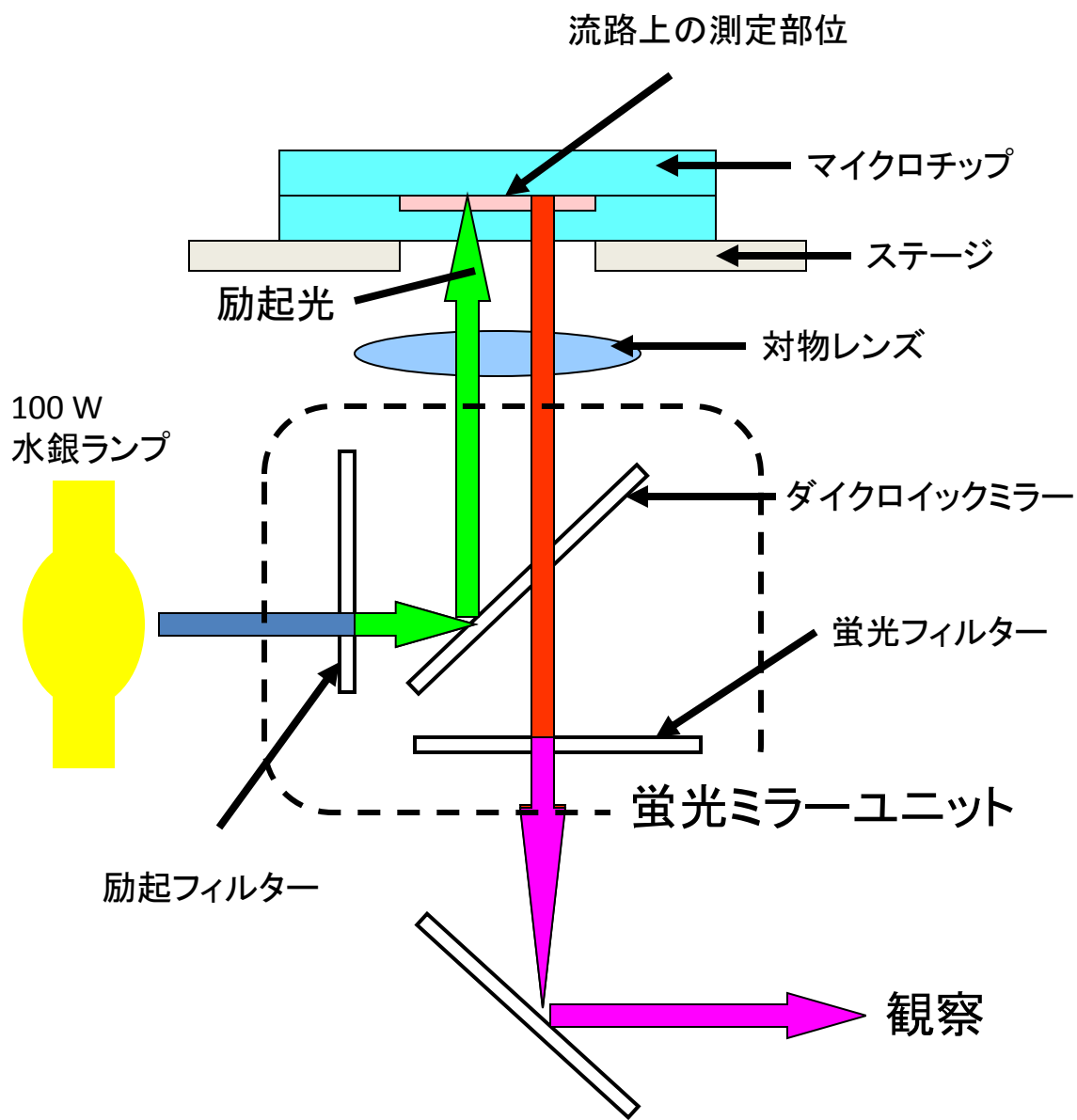


図3-4. 蛍光顕微鏡の光路図

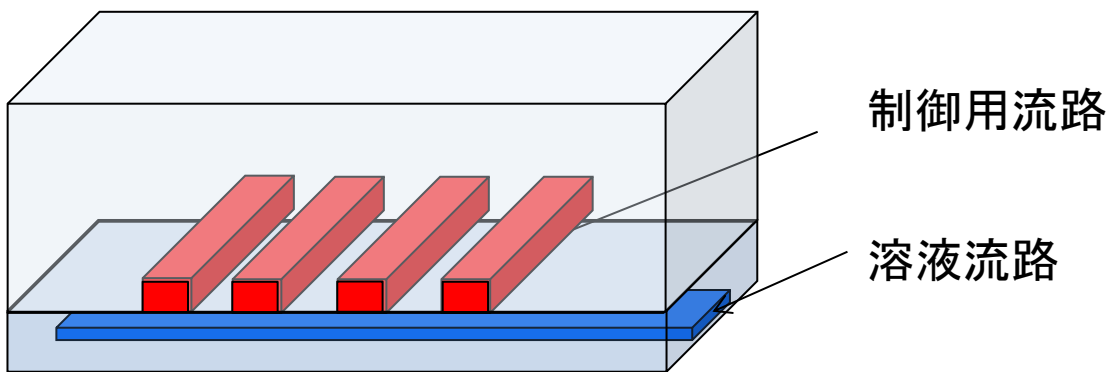


図3-5 マイクロポンプの概念図

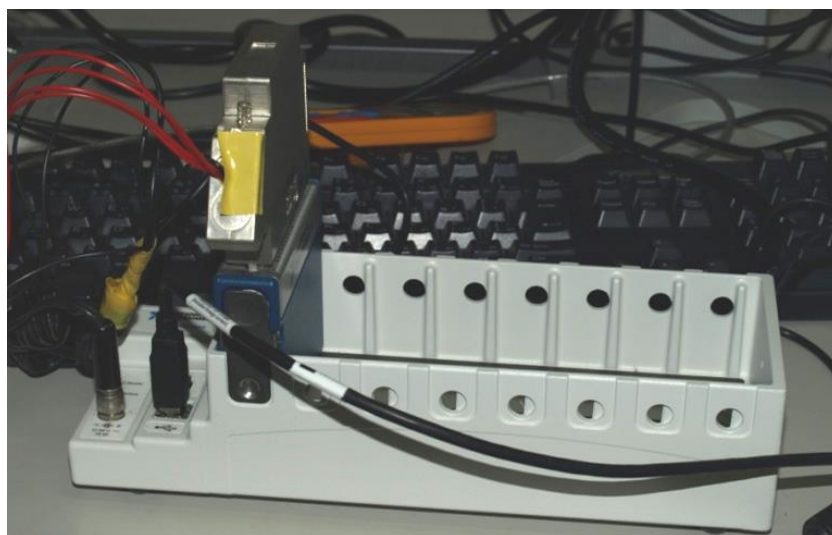
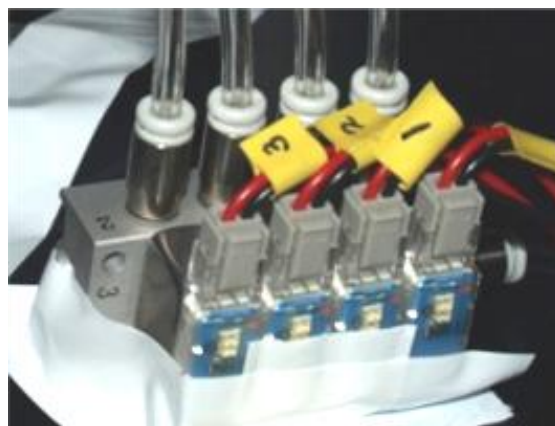
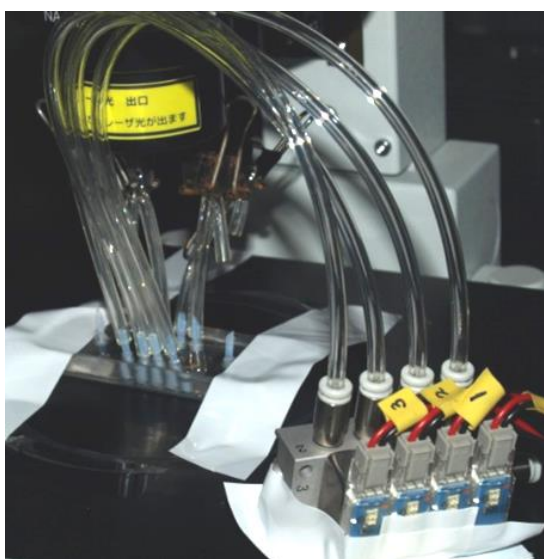


図3-6 マイクロポンプ制御装置
ソレノイドバルブ(上図)とデジタルスイッチ(下図)

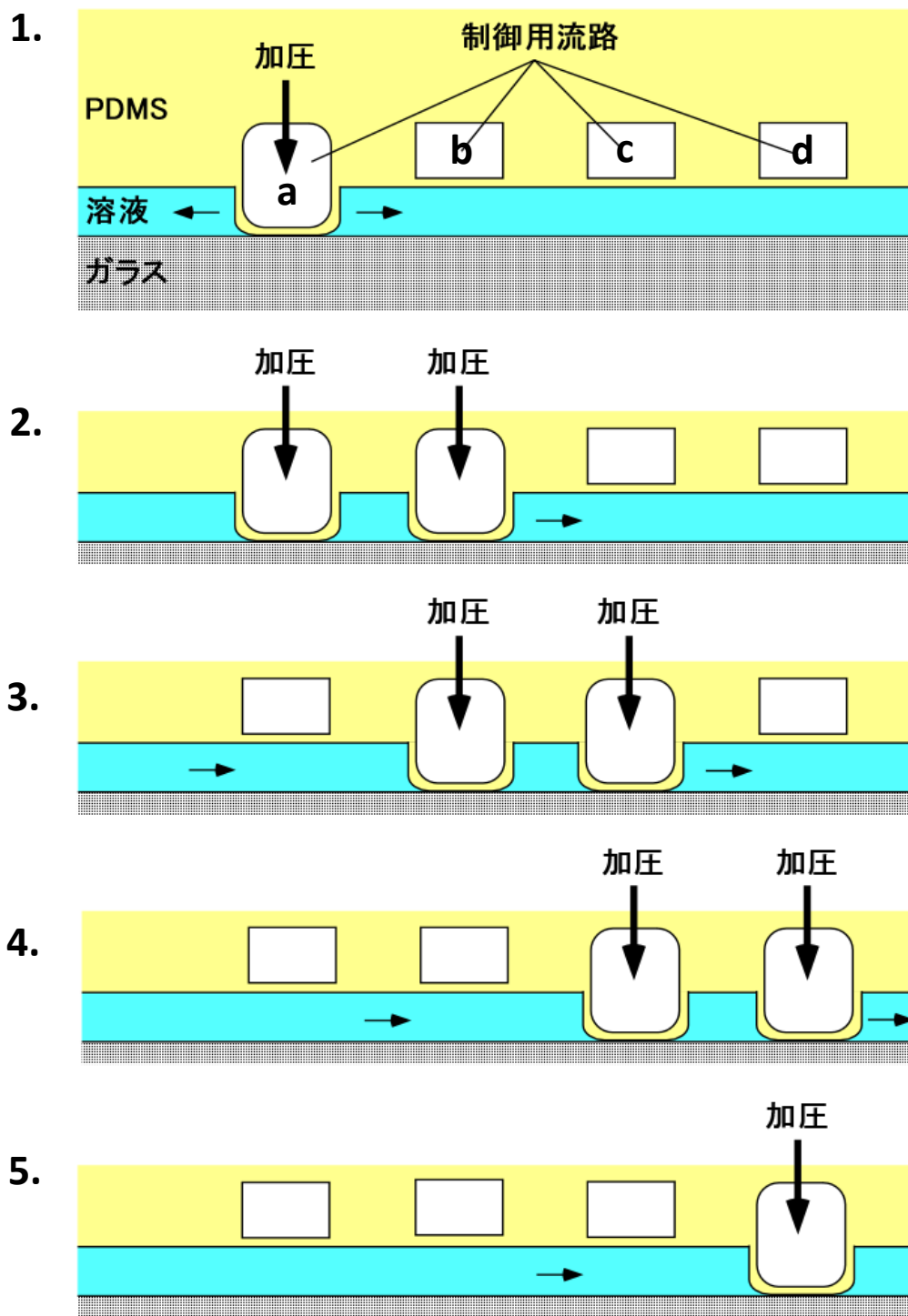


図3-7 マイクロポンプの動作

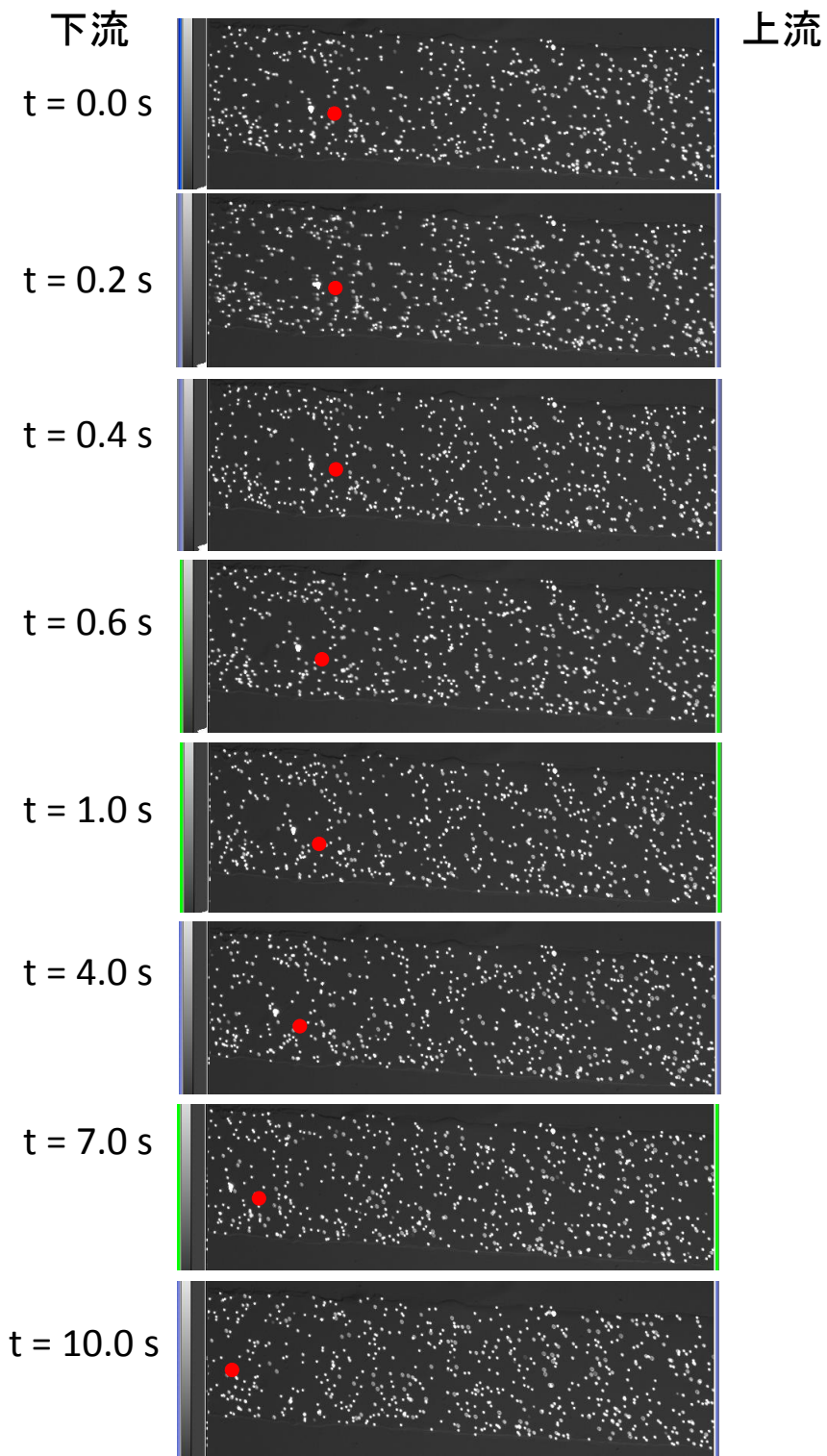


図 3-8 マイクロポンプによる溶液駆動
同一粒を赤色のドットで示した

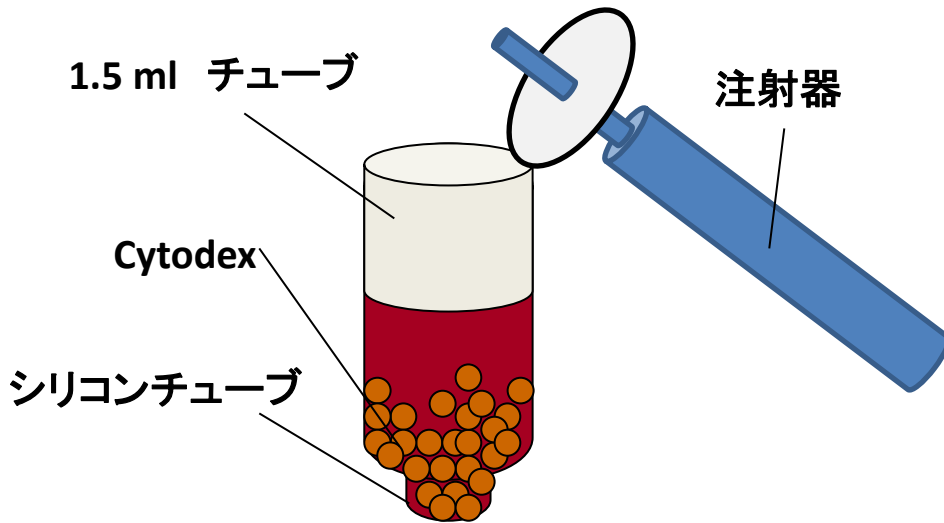


図 3-9 マイクロキャリアー導入デバイス

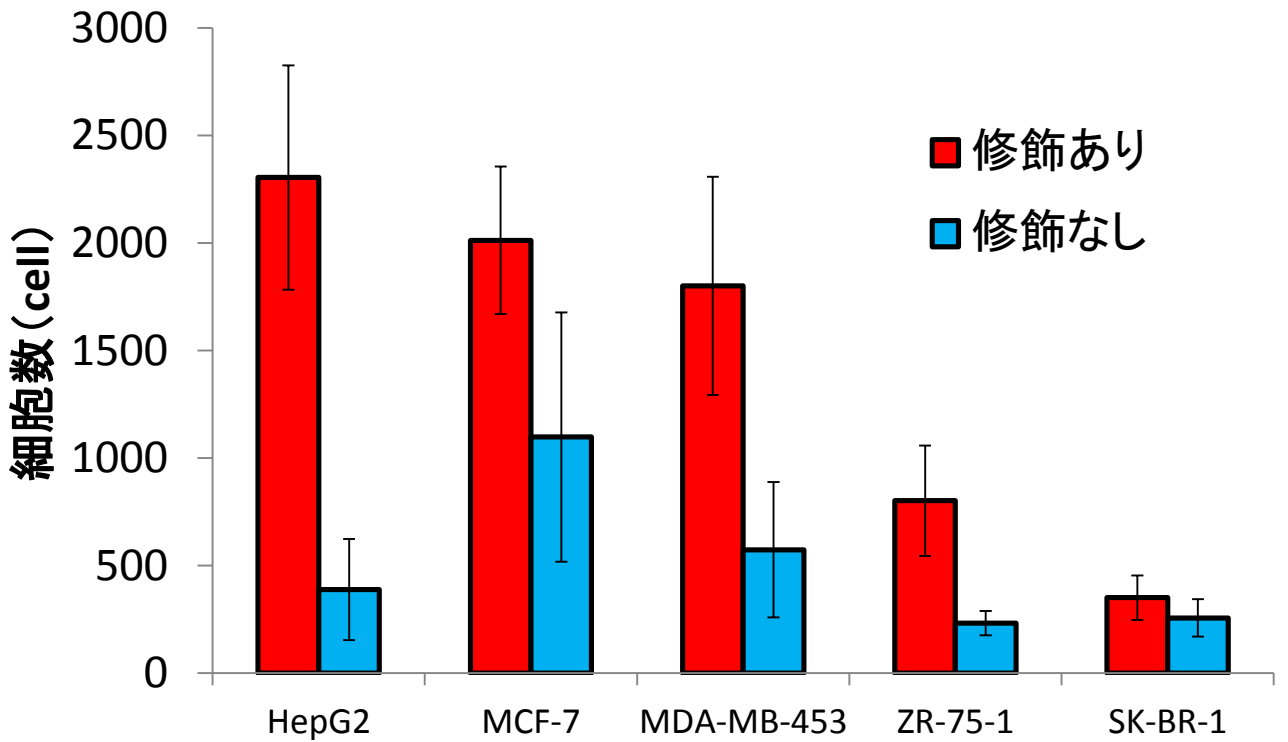


図 3-10 水平流路に接着した細胞数

(n=3)

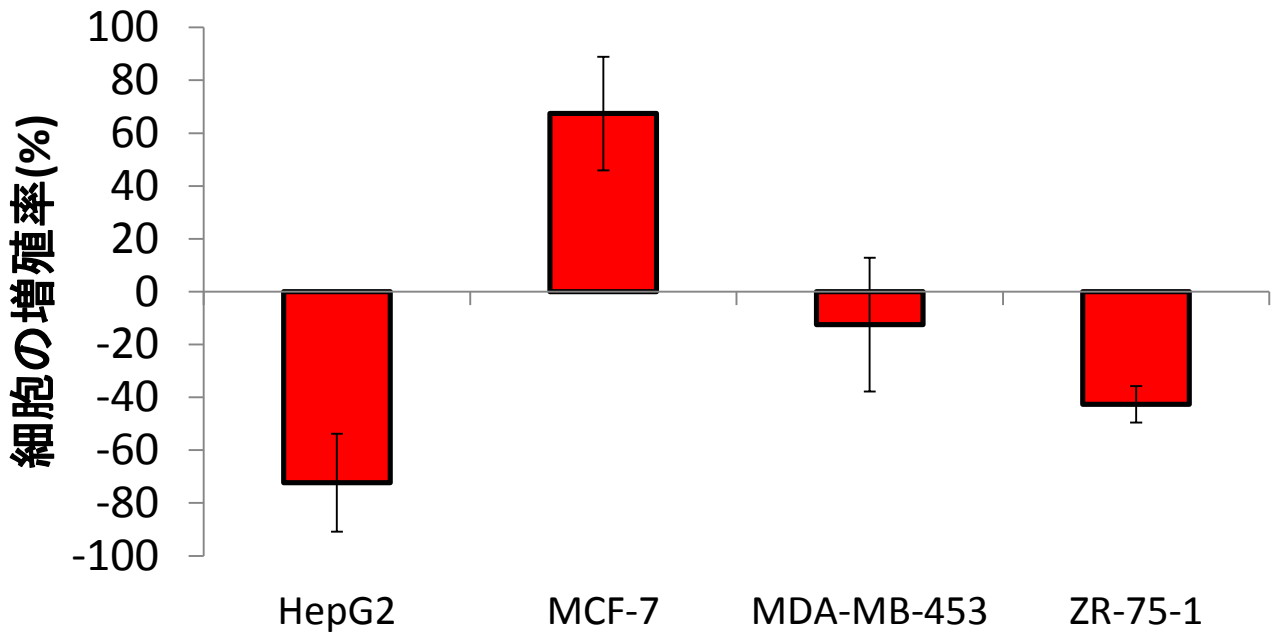


図 3-11 チップ内での細胞生育

(n=3)

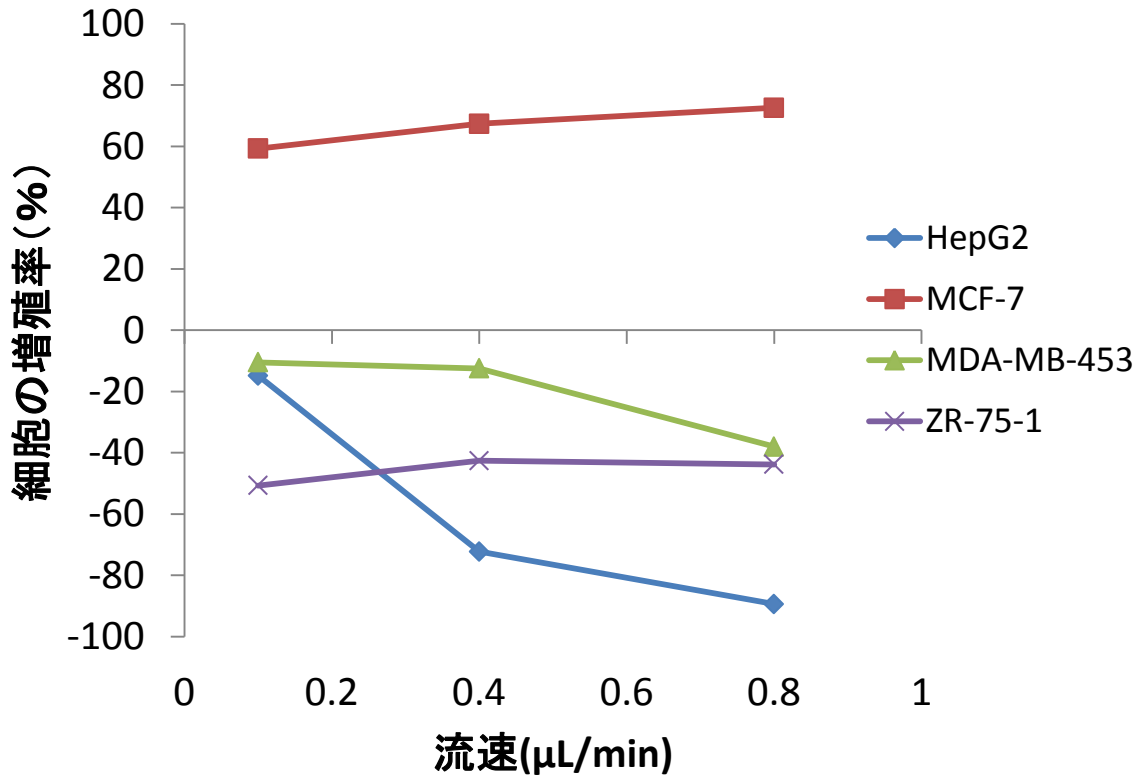


図 3-12 流速が細胞増殖率に及ぼす影響

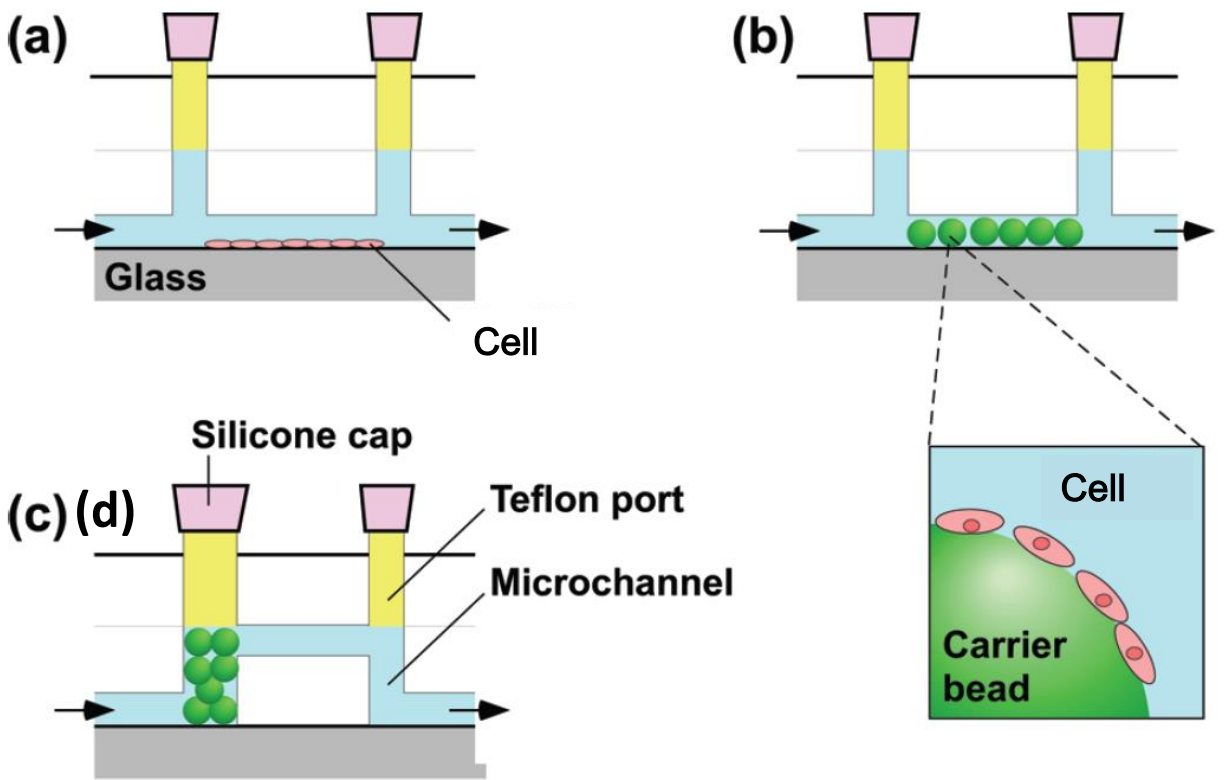


図3-13. CytoDexの充填方法

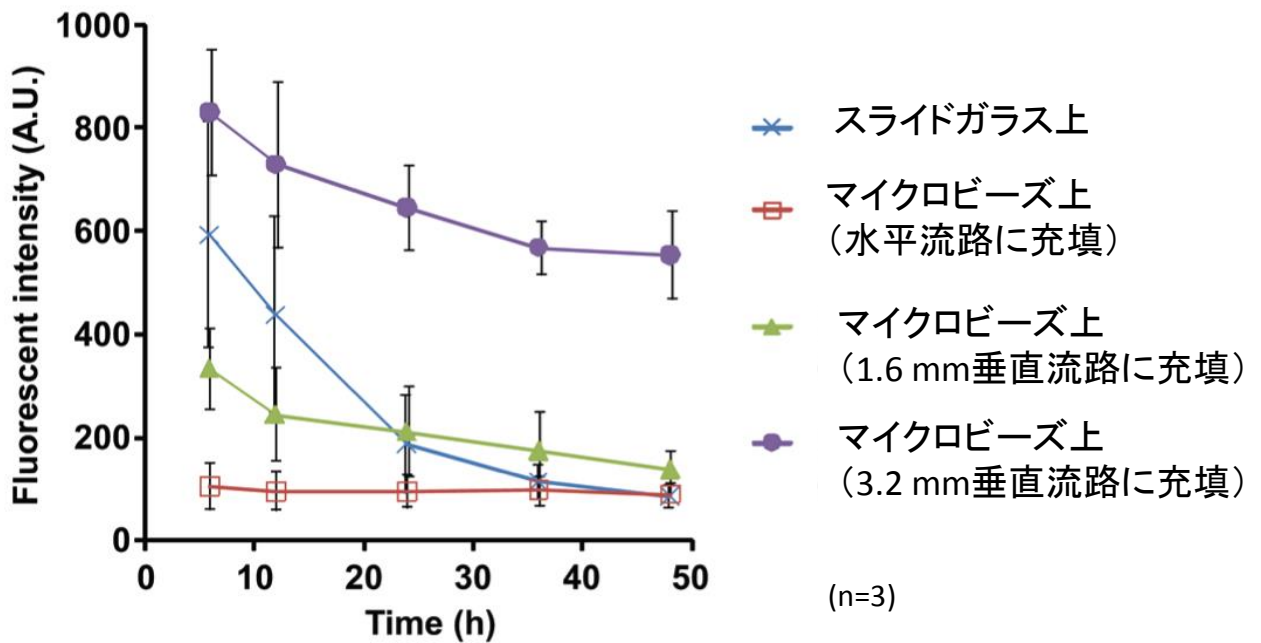


図 3-14 HepG2細胞の培養

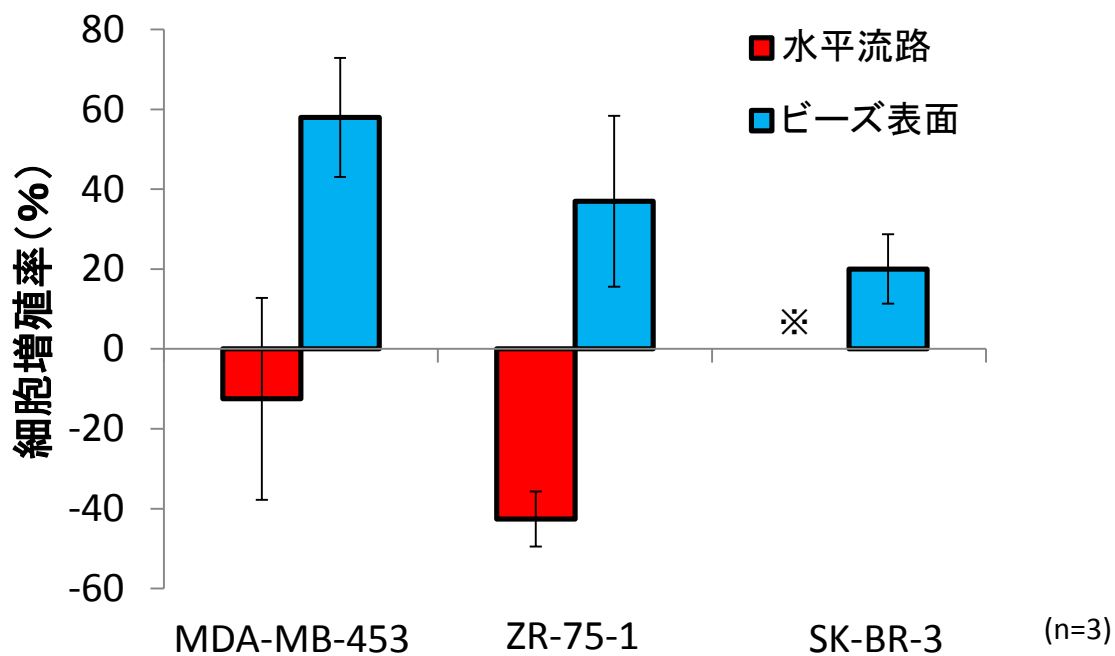
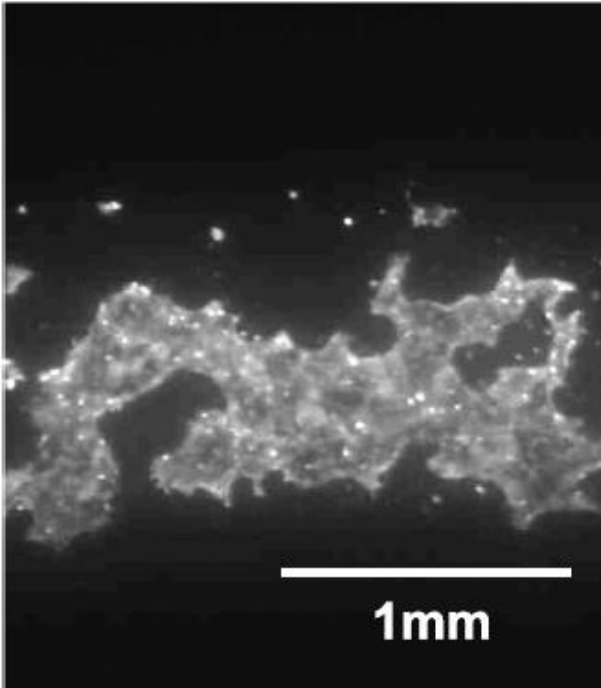


図 3-15 ビーズを用いた乳癌細胞のマイクロチップ内培養

※SK-BR-3細胞を水平流路で培養した実験はデータ無し

A)



B)

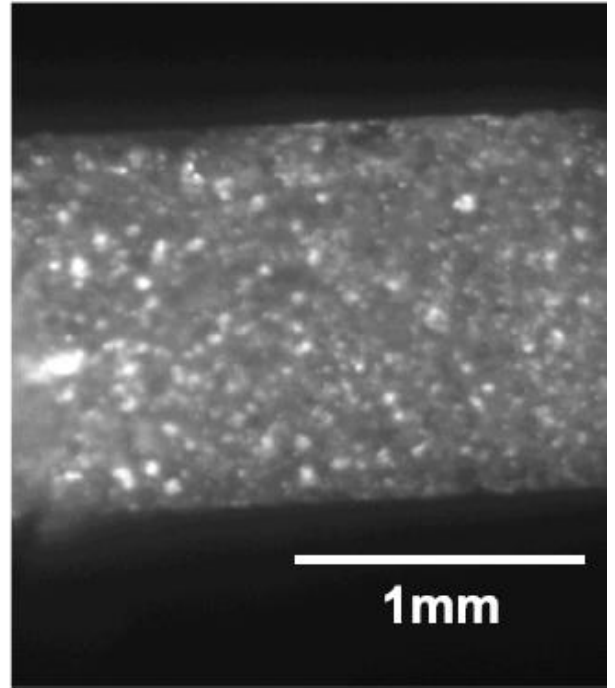


図 3-15 Caco-2細胞の培養

A)流路高が200 μm の場合

B)流路高が1 mmの場合

表3-1 マイクロポンプ流速

溶液流路 高さ (μm)	PDMS薄膜 厚さ (μm)	流速 (nL/min)	線流速 (mm/min)
15	50	4.4	1.47
30	100	8.1	1.35
50	100	11.8	1.18
100	150	25	1.25

4 章 マイクロチップを用いた模擬臓器の開発

緒言

本章では 2 章で作製したマイクロチップを用いて、3 章で構築した細胞培養技術などを行うことにより、生体内の種々の臓器のマイクロモデルを作製した。

本研究で開発した部位は以下の通りである。

・模擬消化管部位(マイクロ消化管組織)

消化管内における物質の体内動態の研究では、胃の酸性環境、消化液に含まれる消化酵素による分解、胆汁による乳化などが主な研究対象として知られている。特に薬学の分野で胃液の酸性度は薬剤を失活させることがしばしばあり、崩壊試験として日本薬局方に試験手法が記されている。本研究のマイクロ消化管部位では、人工胃液および人工腸液による物質の消化の評価を試みた。人工胃液には塩酸と消化酵素ペプシンを用い、人工腸液には消化酵素パンクレアチンとブタ胆汁抽出物を用いた。この人工腸液は生体の腸液を模したのではなく、膵液・腸液・胆汁を合わせて模したものであり、経口摂取した物質の腸内動態を評価するのに用いられる(Makioka *et al.*, 2006)。人工胃液の中和には水酸化ナトリウムを用いた。

・標的部位

バイオアッセイの標的となる細胞を培養する標的部位は、3 章で検討した通り MCF-7 細胞を水平流路上に培養する構造とした。本研究では MCF-7 細胞の増殖促進や死滅を測定することで生理活性の評価を行う。MCF-7 細胞に対してモデル薬剤を作用させることで、目的とする応答が得られるかどうかの検討を行った。各種乳癌に対する抗癌剤は MCF-7 細胞の生育を阻害し、エストロゲン様活性物質は生育を促進させることが期待される。

・模擬腸上皮部位(マイクロ腸上皮組織)

マイクロ腸上皮組織では 3 章で検討した Caco-2 細胞のレイヤーを用いて、物質の透過試験を行った。腸管から吸収されやすい薬剤は細胞レイヤーを透過し、細胞を透過しない LY は basolateral 側へ輸送がされないことが期待される。

・模擬肝部位(マイクロ肝組織)

マイクロ肝組織では HepG2 細胞を用いてモデル薬剤の代謝を行った。マイクロチップ内で HepG2 細胞を培養する方法については 3-3-2 で検討を行ったが、その際はレサズリンの還元活性のみを測定した。本章では肝細胞に特徴的な代謝酵素の活性に関してもバイオアッセイで評価を行い、マイクロ肝組織の構造を決定した。マイクロ肝組織の下流に標的部位を設置し、MCF-7 細胞の増殖を観察することでマイクロ肝組織の代謝活性を評価した。モデル試薬として、代謝を受けて活性を示すプロドラッグである CPA を使用した。

・模擬腎部位(マイクロ腎組織)

マイクロ腎組織では、透析膜を隔てた物質透過を評価した。通常透析膜は低分子を透過させて高分子は透過させないが、片側にタンパク質等が含まれていると、吸着しやすい物質は透過が減少する。これは腎臓における糸球体濾過を模したものである。

・模擬心臓部位(マイクロポンプ)

第 3 章で検討したマイクロポンプを用いて、閉鎖流路の溶液駆動を行った。マイクロポンプの駆動については 3-2 で検討を行い、蛍光ビーズの流れを観測することで流速を求めた。本章では閉鎖流路内の溶質の挙動を測定するため、4-5 で開発したマイクロ腎組織とマイクロポンプを組み合わせた。4-5 で行った物質透過を閉鎖流路内にて応用することで、物質排出の経時的な変化を測定した。

4-1 方法

4-1-1 マイクロチップを用いたバイオアッセイ

3 章で述べた方法で MCF-7 細胞を培養し、生理活性物質を含んだ培地をシリンジポンプで送液してバイオアッセイを行った。生理活性物質として 5 μM EPI, 1 μM DTX, 50 μM TEPA, 1 mM CPA, 15 mM TGF, 1 nM E2, 2 μM IF, 5 μM TAM を使用した。流速は 0.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ で培養期間は 2 日間とした。レサズリン法でアッセイ開始前と終了後の細胞数を測定した。

4-1-2 マイクロ消化管組織を用いた消化実験

a) 人工胃液

100 $\mu\text{g/mL}$ アルブミン水溶液を消化実験試料として用いた。人工胃液による消化を評価するため、人工腸液は流さなかった。消化は胃に見立てた垂直流路（模擬胃）内で行い、中和液により酵素を失活させた。最下流に設置したポートを通して反応液を回収した。消化産物はトリシン SDS-PAGE により分離検出を行った。

b) 人工腸液

試料溶液として、0.1%オリーブ油懸濁液を用いた。オリーブ油は水に溶けないため、乳化剤としてブタ胆汁抽出物を 3 mg/ml となるようにして用いて消化実験を行った。人工腸液による消化を評価するため、図 4-3 の導入ポート②より人工腸液を導入し、導入ポート③から送液される 50 mM 水酸化トリウム水溶液で混合溶液をアルカリ性にして酵素を失活させた。その後導入ポート④より 50 mM 塩酸を導入し、溶液を中性に戻した。オリーブ油の消化産物の検出は薄層クロマトグラフィーにより行った。

4-1-3 マイクロ腸上皮組織を用いた物質透過試験

3-3-3 で述べた条件で培養した細胞シートを作製し、物質の透過試験を行った。試料溶液として、4.5 μM LY と 2 mM CPA 溶液を用いた。上層流路へは試料を含む培地を、下層流路へはフリーの培地をそれぞれ送液し、上層流路から下層流路への物質の透過を行わせた。ネガティブコントロールとして、支持膜上に細胞を培養していない状態でも同様の実験を行った。この場合選択的な物質透過は行われず、培養支持膜のポア(1 μm 径)を通過できる物質は拡散により自由に下層流路へ入ることができる。送液速度は 1 $\mu\text{L/min}$ とした。24 h 後、上層側と下層側からそれぞれ溶液を回収して溶質の分析を行った。LY は蛍光光度法で、CPA は HPLC 法でそれぞれ定量した。

4-1-4 マイクロ肝組織による代謝を考慮したバイオアッセイ

マイクロ肝組織の下流に 4-1 のマイクロ標的部位を設置し、バイオアッセイを行った。標的細胞は 4-1-1 と同じ条件で培養を行った。マイクロ肝組織は 3-3-2 と同じ条件で設計した。生理活性物質として 1 mM CPA を使用し、送液する培

地に添加した。流速は $0.4 \mu\text{L}/\text{min}$ で培養期間は 2 d とした。レサズリン法でアッセイ開始前と終了後の MCF-7 細胞の細胞数を測定した。

4-1-5 マイクロ腎組織を用いた物質透過試験

試料溶液として、 $10 \mu\text{M}$ LY, $500 \mu\text{M}$ WRF, $500 \mu\text{M}$ FITC-BSA 溶液をそれぞれ用いた。上層流路へは原尿に見立てたバッファーを、下層流路へは血液に見立てた 0.1% BSA と試料を含むバッファーをそれぞれ送液し、下層流路から上層流路への物質の透過を行わせた。ネガティブコントロールとして、BSA を含まない試料溶液でも同様の実験を行った。送液速度はそれぞれ $0.2 \mu\text{L}/\text{min}$ とし、1 d 後にサンプルを回収し、それぞれの定量を行った。

4-1-6 マイクロポンプを用いた物質排出試験

マイクロ腎組織とマイクロポンプを組み合わせた。4-1-5 で行った物質透過を閉鎖流路内にて応用することで、物質排出の経時的な変化を測定した。閉鎖流路はマイクロポンプにより溶液の駆動を行った。ネガティブコントロールとして、マイクロポンプを駆動させずに排出実験を行った。マイクロ腎組織の下層流路は閉鎖流路の一部である。上層流路へは外部からマイクロシリンジポンプを用いて送液を行った。

閉鎖流路へ $10 \mu\text{M}$ の LY/ 0.1% BSA 溶液を充填し、マイクロシリンジポンプで上層流路へバッファーを $50 \text{ nL}/\text{min}$ (マイクロシリンジポンプの最低速度)で送液した。流路内の残存 LY 濃度は、閉鎖流路のマイクロポンプ部上流を顕微鏡で観察し、その蛍光により推定した。上層流路へ排出された LY は蛍光光度法で測定した。また、 $500 \mu\text{M}$ WRF についても同様の排出試験を行った。

結果と考察

4-2 マイクロ標的部位

4-2-1 マイクロチップの設計

マイクロチップの概略図を図 4-1 に示す。上層シートを直接スライドガラスに貼り付けたシンプルな構造のマイクロチップを作製した。培養チャンバーのサイズは $0.2 \times 4 \times 1.5 \text{ mm}$ ($H \times L \times W$) とし、フィブロネクチンで修飾を行った。オーバーナイトで培養を行うと、およそ 2000 個の細胞がマイクロチップに接着した。

4-2-2 バイオアッセイ

バイオアッセイの結果を図 4-2 に示す。抗癌剤を用いた場合は細胞が死亡し、エストロゲン様物質では細胞増殖が増加する傾向が見られた。プロドラッグである CPA と TGF は他の抗癌剤と比較して抗癌活性が小さい結果となった。これは乳癌細胞では代謝酵素の産生が十分でなく、前駆体による作用に留まったのが原因であると考えられる。E2 は微量でも高い増殖増加作用を示した。IF は E2 と比較すると弱い活性ながら増殖増加作用を示した。TAM はエストロゲンのアンタゴニストとして知られており、増殖増加作用は僅かであった。

本アッセイの結果、MCF-7 細胞の増殖・死滅を測定することで、モデル試薬の生理活性を評価することができた。標的部位のスケールに関して、抗癌剤を使用しても培養細胞が完全に全滅することなどもなく、増殖を行う余地も十分に残されていた。それゆえ、マイクロ標的組織はこの条件を最適条件とした。

4-3 マイクロ消化管組織

4-3-1 マイクロチップの設計

マイクロチップの概略図を図 4-3 に示す。システムの設計は、複数のシリンジを用いて溶液を次々と混合することにより、順次消化反応を行う仕様とした。端の導入口から試料を、隣接する導入口から人工胃液を導入し、下方に設けた垂直流路にて人工胃液による酸性条件下での消化を行った。次の導入口から中和液を流し、pH を中性に戻した。最後に次の導入口から人工腸液を流し、パンクレアチンによる消化と胆汁による乳化を行った。最後に廃液を回収し分析に供した。

まず、試料・人工胃液・中和液・人工腸液の組成、流速比と pH について検討を行った。胃の生理的な pH は 2~3 程度であり、中和を終えた後の十二指腸の pH は 6~8 程度である。各臓器に該当する部位における pH はこの値に近いものでなければならない。すなわち試料溶液と混合されることで人工胃液は薄まり、結果として pH が 2 程度になるべきである。しかしながら、混合前の人工胃液の pH を低く設定しすぎること、酵素が失活してはならない。以上のような課題を解決する必要がある。

このシステムでは 4 種類の溶液を導入する必要がある。最適な反応条件を実現するには、各溶液の流量を任意に設定できることが望ましい。しかしながらシリンジポンプを 5 台並べることは、実験空間的にもコストの点でもふさわしくない。現状では 10 連のシリンジポンプシリンジを 4 本セットして一括で制御しているが、プランジャーの移動速度はどれも同じになるため、各溶液の流量比は用いるシリンジの断面積比と同じ値になる。本実験で使用する流領域で使いやすい市販小型シリンジのサイズとしては 1 ml と 2.5 ml のものがあり、その断面積比は 3.5 であるため、この比率でしか流量比が設定できない。そこでこの条件のもと、各部位での pH 調整や消化が適切に行われるような条件を探した。試料溶液に対する消化液の割合が大きいと、試料の希釈がされることになるため、原液の濃度を上げなくてはならない。それを避けるため、試料溶液に 2.5 ml のシリンジを用い、人工胃液・中和液・人工腸液には一律で 1 ml のシリンジを用いることとした。

4-3-2 物質消化実験

a) 人工胃液によるアルブミンの消化実験

人工胃液による消化を行う模擬胃のサイズ、および人工胃液を導入する流速を変化させることでアルブミンの消化具合を調べた。模擬胃の流路条件と、その条件下で

のアルブミン消化実験の結果を図 4-4 に示す。トリシン SDS-PAGE はグリシンを用いた通常の SDS-PAGE に比べ、高分子量のタンパク質の分離がシャープに行われないうというデメリットを持つ反面、低分子量の分離を上手く行うことができるというメリットがある。これはトリシンの水酸基による影響で、pKa がグリシンより若干低いことに起因する。このため電気泳動の際トリシンの先端がグリシンの時よりも若干先んじることとなり、より低分子のペプチドに対しても分離を行うことが可能となる。タンパク質の消化産物は低分子であると考えられるのでこの方法を用いた。

アルブミン(分子質量 66 kD)および人工胃液(ペプシンの分子質量 38kD)単品では、それぞれに対応する位置にバンドが確認された。消化実験を行った結果、いずれの条件においても低分子側にスミアとなるバンドが確認された。これはアルブミンの消化生成物であると考えられる。今回検討した条件では、残存アルブミン量・生成ペプチド量のどちらにおいても条件間で差は見られなかった。これは、今回の条件が実験に対して過剰なために差が見られなかったのだと考えられる。

b) 人工腸液によるオリーブ油の消化実験

人工腸液および模擬十二指腸においても同様に条件検討をしようと試みた。オリーブ油の主成分はトリオレイルグリセリド(TG)であり、パンクレアチンによる消化産物は単鎖不飽和脂肪酸であるオレイン酸(FA)とジオレイルグリセリド(DG)、モノオレイルグリセリド(MG)、グリセリンであると考えられる。それらのスタンダードの TLC の結果を図 4-5 a)に示す。まず予備実験として、マイクロタイタープレートを用いて消化実験を試みた。図 4-5 b)にした通りオリーブ油が消化され、オレイン酸が生成しているのが確認された。消化時間を増やすにつれ、オレイン酸の生成量がやや増加していることが確認され、60 min の反応後には MG の生成がはっきりと確認された。しかし、マイクロチップを用いた消化実験では、オリーブ油やその消化産物の検出ができなかった。これには 2つの原因が考えられる。一つはオリーブ油を懸濁した試料溶液がシリンジ内で分離し、キャピラリーを通じて水相だけがマイクロチップ内へ送られてしまった場合である。もう一つはマイクロチップ素材である PDMS の表面にオリーブ油が吸着して回収出来なかった場合である。本研究においては予備実験において適切な消化が行えたと考えられる 60 min の反応条件をもとに模擬十二指腸の条件を決定することとした。

模擬胃と模擬十二指腸の検討の結果、マイクロ消化組織の構成を表 4-1 のように決定した。

4-4 マイクロ腸上皮組織

4-4-1 マイクロチップの設計

マイクロチップの概略図を図 4-6 に示す。上層シートと中層シートの上に培養支持膜を挟み込んだ。培養支持膜を隔て上層流路と下層流路が面しており、物質の透過を行うことができる。上層流路は培養支持膜のコラーゲンがコートされている側と面しており、細胞を培養することができる。培養チャンバーのサイズは $1 \times 4 \times 1.5 \text{ mm}$ ($H \times L \times W$) とした。2本のシリンジを用い、上層流路と下層流路へそれぞれ送液を行った。

4-4-2 物質透過試験

透過試験の結果を図 4-7 に示す。細胞を培養していないネガティブコントロールの実験においては LY, CPA 共に高い透過を示した。Caco-2 細胞を培養した条件では LY の透過が大きく減少した。しかし CPA の透過は培養支持膜に細胞を培養していても LY ほど小さくならず、特に Caco-2 細胞においては細胞を培養していないときとほぼ変わらない数値を示した。

これは Caco-2 レイヤーによる物質の選択的透過が機能していたことを示す。すなわち上方流路と下方流路に挟まれた培養支持膜上の Caco-2 細胞層が2つの流路を遮断し、細胞を通した透過のみを行ったということである (図 4-8)。LY は細胞透過性が乏しく、CPA は透過性が高い。このことから本透過試験から妥当な結果が得られ、マイクロ腸上皮組織が正しく機能していると考えられる。

4-5 マイクロ肝組織

4-5-1 マイクロチップの設計

マイクロ肝組織とマイクロ標的部位は図 4-9 のように複合させた。検討した 4 種類のマイクロ肝組織 a-d の概略図を図 4-10 に示す。マイクロチップは全て上層シートと中層シートから構成される。a のチップはフィブロネクチンでコートした $0.2 \times 4 \times 1.5 \text{ mm}$ ($H \times L \times W$) の水平流路に HepG2 細胞を培養し、b-d では表面に HepG2 細胞を培養した Cytodex をマイクロチップへ充填した。b では $1 \times 4 \times 1.5 \text{ mm}$ ($H \times L \times W$) の水平流路に、c では $1.6 \times 3 \text{ mm}$ ($i.d. \times L$) の垂直流路に、d では $3.2 \times 3 \text{ mm}$ ($i.d. \times L$) の垂直流路に充填した。マイクロ肝組織とマイクロ標的組織の間は一度垂直流路を隔てており、組織間での細胞の混合を防いだ。

MCF-7 細胞はアッセイ開始前日にシーディングし、HepG2 細胞はマイクロチップ a においては同じくアッセイ開始前日に、b-d では外部で 5 日間細胞培養した Cytodex をアッセイ開始直前に充填した。

4-5-2 物質代謝試験

バイオアッセイの結果を図 4-11 に示す。a-c のチップでは薬剤および HepG2 細胞を含まないコントロールの実験と比較すると生存率が減少していたが、あまり高い抗癌活性が発揮されなかった。一方 d のチップでは MCF-7 細胞の約 60%が死亡した。このことから代謝活性の面でも 3-3-2 と合致した結果が得られ、d の構造、すなわち $3.2 \times 3 \text{ mm}$ ($i.d. \times L$) の垂直流路に HepG2 細胞を培養した Cytodex を充填する方法が肝臓機能のモデルとして適していると考えた。

4-6 マイクロ腎組織

4-6-1 マイクロチップの設計

マイクロチップの概略図を図 4-12 に示す。4-3 のマイクロ腸上皮組織のマイクロチップと類似した構造にした。上層シートと中層シートの上に透析膜を挟み込んだ。透析膜を隔てて上層流路と下層流路が面しており、物質の透過を行うことができる。両流路の接触部位はそれぞれ $4 \times 0.5 \times 0.05$ mm ($L \times W \times H$) とした。上層流路は尿細管を模しており、上層流路を流れる液体は原尿を模している。下層流路は血管を模しており、流れる液体は腎臓へ来た血液を模している。下層流路は一度チップ下部へ潜らせた立体的な構造とした。2本のシリンジを用い、上層流路と下層流路へそれぞれ送液を行った。

透析膜は分子量の大きな物質は透過させないが、低分子は拡散により自由に通過することができる。しかし下層流路のフローに BSA のような吸着性の高い物質が含まれていた場合、BSA と強く相互作用するので低分子であっても透過は小さくなる。

4-6-2 物質透過試験

透過試験の結果を図 4-13 に示す。FITC-BSA は試料溶液に BSA を添加した場合としない場合で、共に透過係数が小さかった。これは FITC-BSA の分子質量 (66 kDa) が透析膜のポアサイズ (MWCO = 12,000) と比較して大きいため、FITC-BSA が上層流路側へ透過できなかったことを表している。一方低分子である LY と WRF は、試料溶液に BSA を添加していない場合、高い透過を示した。しかし試料溶液に BSA を添加した場合、無添加時と比較して透過係数が小さくなった。これは BSA にこれら試薬が吸着することにより、膜透過ができるフリーの状態が存在する量が減少したためと考えられる。LY は BSA を添加しても無添加時の 67% 程度の透過を保っていた。しかし WRF は BSA を添加することで無添加時の 12% まで透過が減少した。このことは WRF が LY よりも BSA に対する結合性が高いことを示している。WRF の血漿タンパク質結合率は 99.5% と非常に高く、得られた結果はこの性質と合致している。また LY は 2 つのスルホ基を有していて水溶性が高いため、水溶液中では WRF ほど BSA に対して吸着していないと考えられる。以上からマイクロ腎組織では物質の性

質に合致した透過を行うことが出来たと判断した。

4-7 マイクロポンプ

4-7-1 マイクロチップの設計

マイクロチップの概略図を図 4-14 に示す。上層シート、中層シート、薄層シートから構成される。上層シートと中層シートの上に透析膜が挟み込まれた。透析部位のサイズは $4 \times 0.5 \times 0.05 \text{ mm}$ ($L \times W \times H$) とした。閉鎖流路は水平流路が全長 $60 \times 0.2 \times 0.05 \text{ mm}$ ($L \times W \times H$)、中層シートを貫く垂直流路は直径 $0.25 \times 3 \text{ mm}$ ($i.d. \times L$) が 2 本である。その他、垂直流路の設置箇所に $1 \times 0.05 \text{ mm}$ ($i.d. \times L$) のジョイントを設置した。ジョイントは 2 本の垂直流路の上面と下面に存在するので計 4 箇所が存在する。閉鎖流路の容積はこれらの合計値の約 $1.2 \text{ }\mu\text{L}$ である。導入ポートからのコンタミネーションを防ぐため、導入ポートは閉鎖流路の真上ではなく、わずかに離れた所に設置した。閉鎖流路へ溶液を導入した後は、ポート内から溶液を取り除き、ミネラルオイルをポート内部へ充填した。

閉鎖流路はマイクロポンプにより溶液の駆動を行った。本実験条件におけるマイクロポンプの送液速度は 11.8 nL/min であり、およそ 100 min で溶液が閉鎖流路を循環する計算となる。ネガティブコントロールとして、マイクロポンプを駆動させずに排出実験を行った。マイクロ腎組織の下層流路は閉鎖流路の一部である。上層流路へは外部からマイクロシリンジポンプを用いて送液を行った。

4-7-2 物質排出試験

排出実験の結果を図 4-15 に示す。ポンプを駆動しなければ LY の排出はほとんど確認されなかった。ここで排出された約 1 pmol の LY は、透析部位に存在している LY の溶存量とほぼ一致している ($10 \text{ }\mu\text{M} \times 4 \times 0.5 \times 0.05 \text{ (mm}^3\text{)}$)。このことから透析膜に接した部分のみから拡散により上層流路への排出が生じており、閉鎖流路内にて対流などで溶質が拡散してはいないと考えられる。ポンプを駆動することにより、閉鎖流路から溶存 LY を排出することができた。閉鎖流路内部の LY は 3 h の駆動でほぼ全てが失われ、その分が上層流路へ排出された。オンサイトで閉鎖流路内部の溶存 LY 物質量を測定するのは非常に困難であったため、マイクロポンプの上流の LY 濃度から全体の物質量を推定した。そのため図は必ずしも閉鎖流路の溶存 LY 量と一致しない。

LY だけでなく WRF を用いて排出実験を行った結果を図 4-16 に示す。LY は

BSA との相互作用が大きくないため、透析膜を透過して良く排出された。2 h の駆動で LY 初期添加量の約 70% が閉鎖流路から排出された。しかし WRF は BSA への吸着が大きいため、3 h の駆動を行ってもほとんど排出がなされなかった。

以上のことから、マイクロポンプは閉鎖流路全域を循環させることに成功したと考えられる。流路内部の溶存 LY は減少し、初期添加量の大部分がマイクロチップ外へ排出された。これは溶存物質が導入ポートなどへ混入していないことを示し、閉鎖流路が完結した回路となっているのだと考えられる。

本システムでは透析部位に溶液が面する時間はおよそ 10 min である。これは流路高が 0.05 mm であることと、上層流路の流速が閉鎖流路よりも速いことを考えると、透析部位に位置する溶存 LY 全量が完全に透過するのに十分な時間である。マイクロポンプにより閉鎖流路を 1 周するのにおよそ必要な時間はおよそ 100 min であり、LY の排出速度が 90 min を境に鈍化することと整合性がとれていると考えられる。

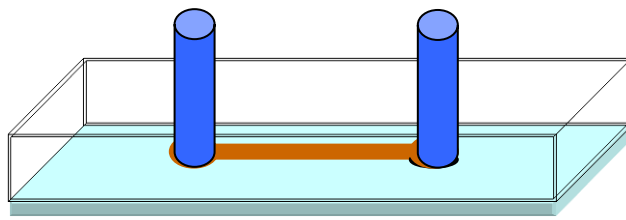


図4-1. マイクロ標的部位チップの模式図

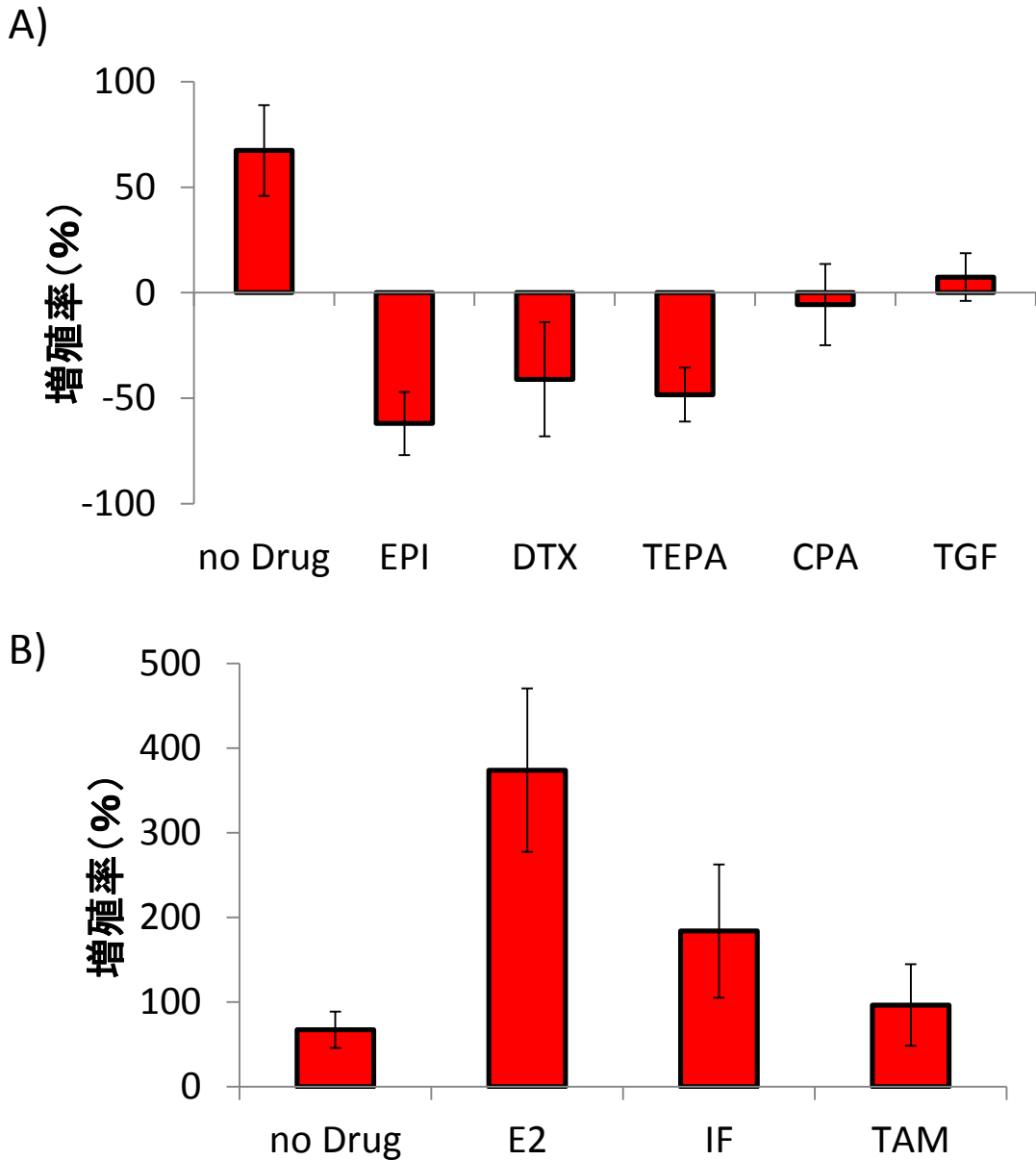


図4-2. 生理活性物質バイオアッセイ結果
A)抗癌剤 B)エストロゲン様物質

(n=3)

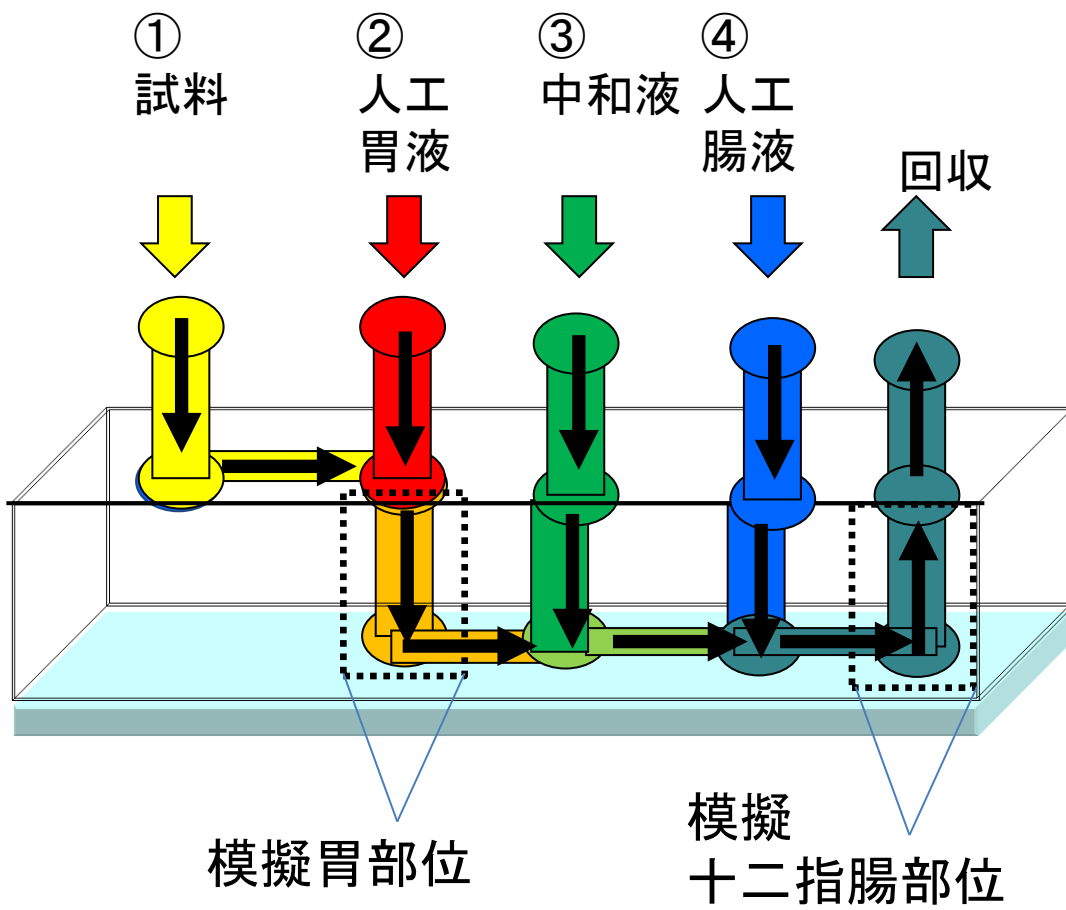
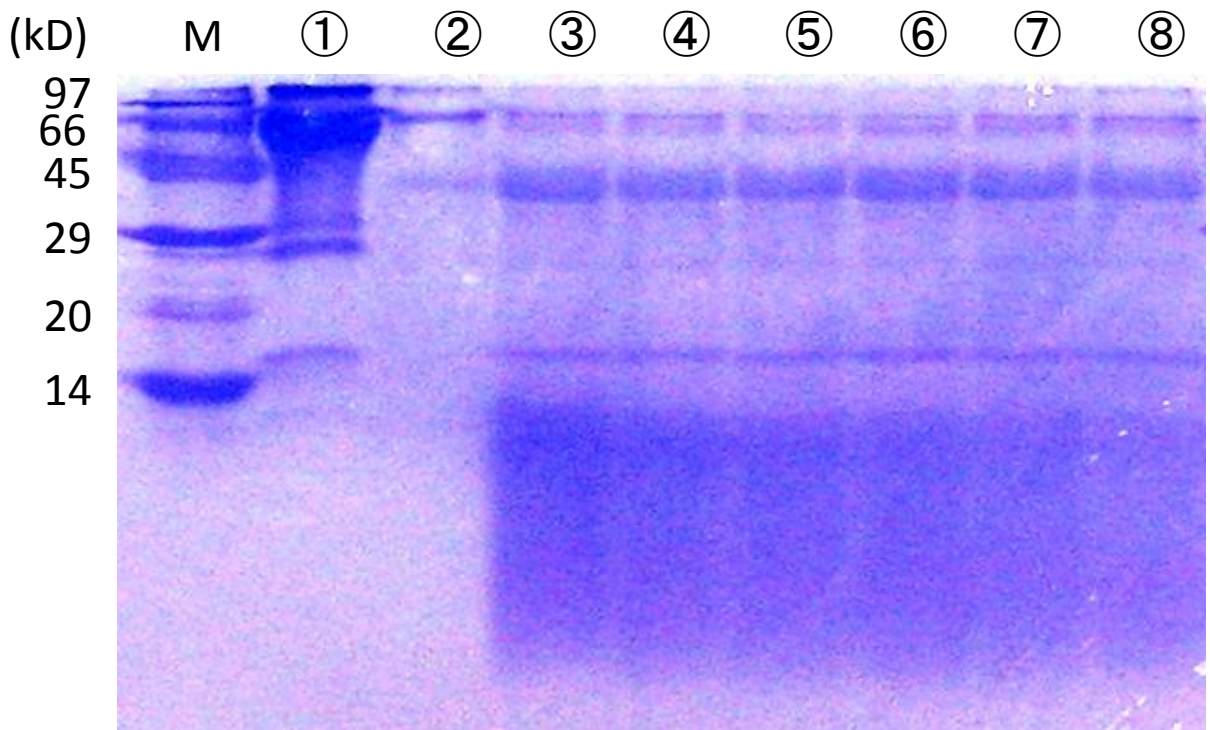


図 4-3 消化を行うマイクロチップの概略図



		模擬胃流路徑 (mm)	試料溶液流速 ($\mu\text{l}/\text{min}$)	模擬胃 滯留時間 (min)
①	アルブミン	-	-	-
②	胃液	-	-	-
③	アルブミン + 胃液	1	0.2	15
④		1	0.1	30
⑤		1.6	0.2	30
⑥		1	0.05	60
⑦		1.6	0.1	60
⑧		1.6	0.05	120

図 4-4 アルブミン消化実験結果

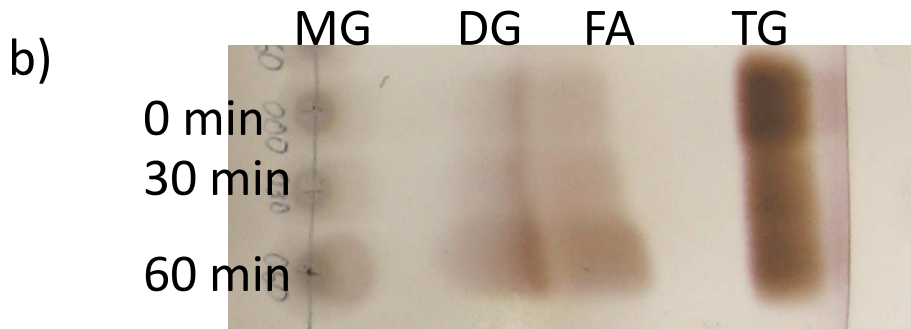
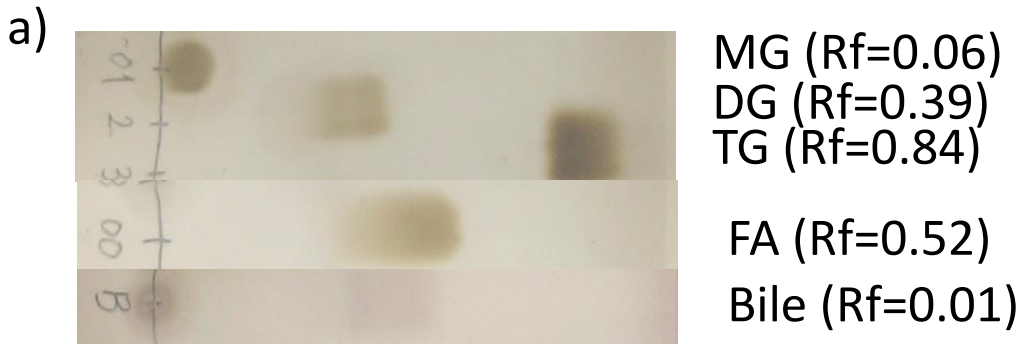


図 4-5 オリーブ油消化実験結果

a) スタンダード試料 b) 予備実験における消化実験結果

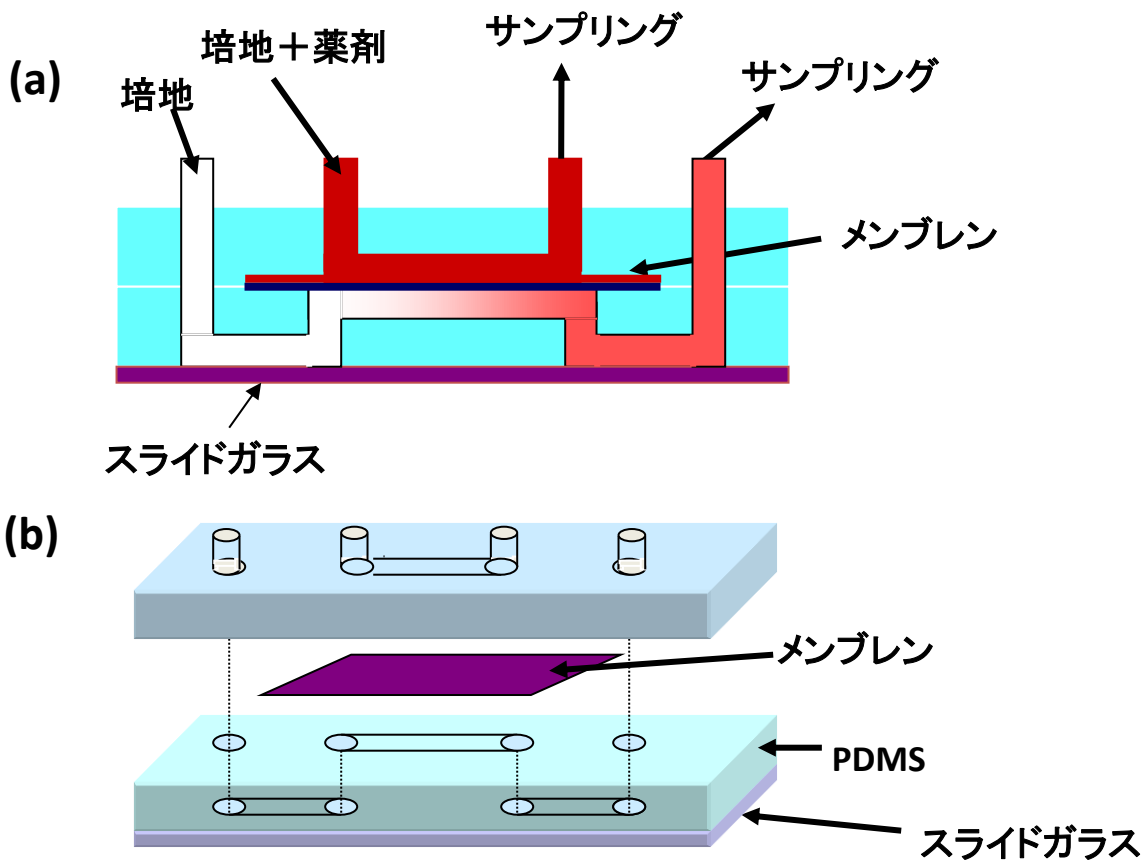


図4-6. マイクロ腸上皮組織チップ
(a)断面図 (b)立体図

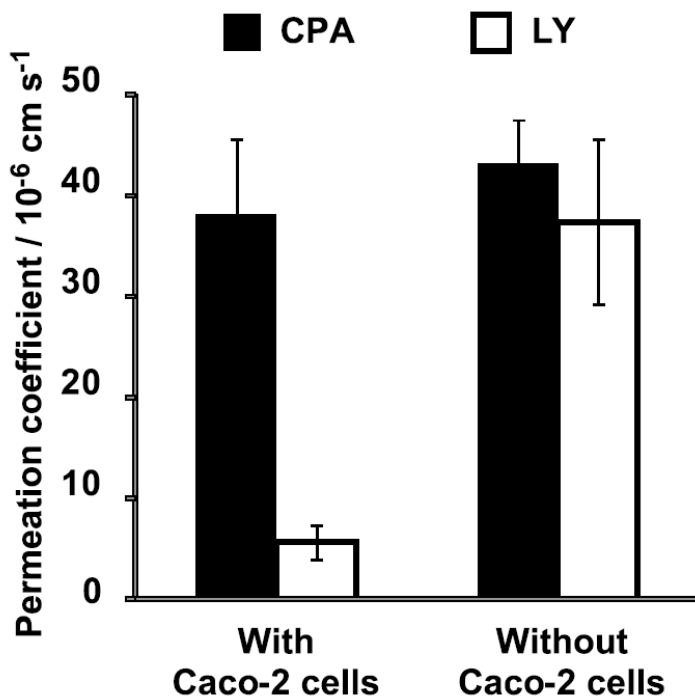


図4-7. 物質透過試験結果

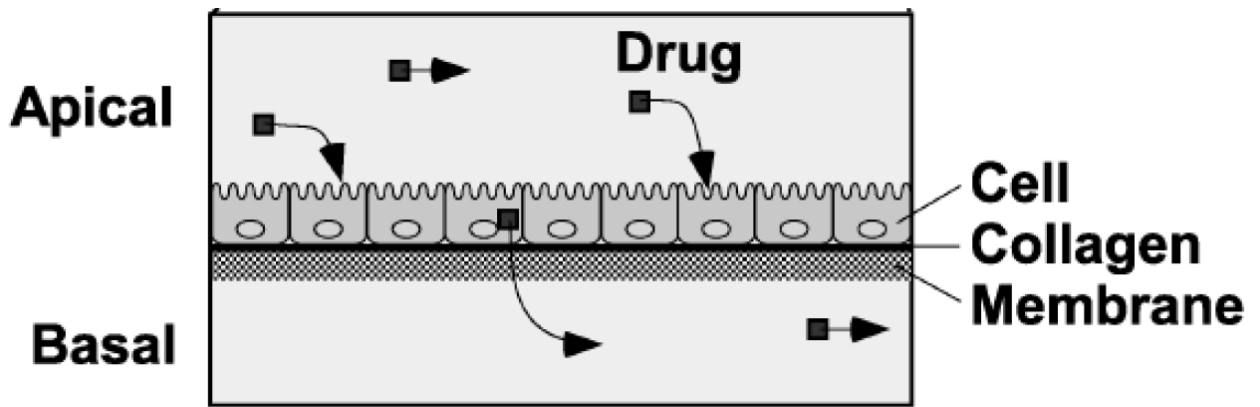


図4-8. マイクロ腸上皮部位 概念図

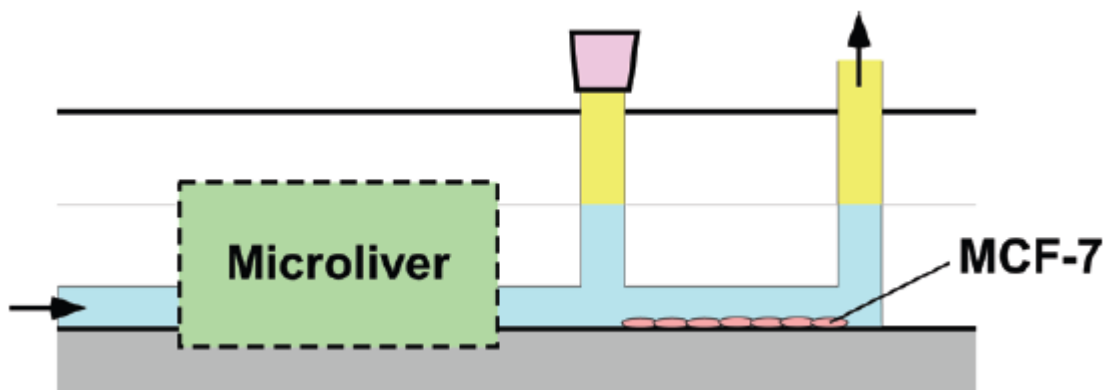


図4-9. マイクロ肝組織-標的部位 複合チップ

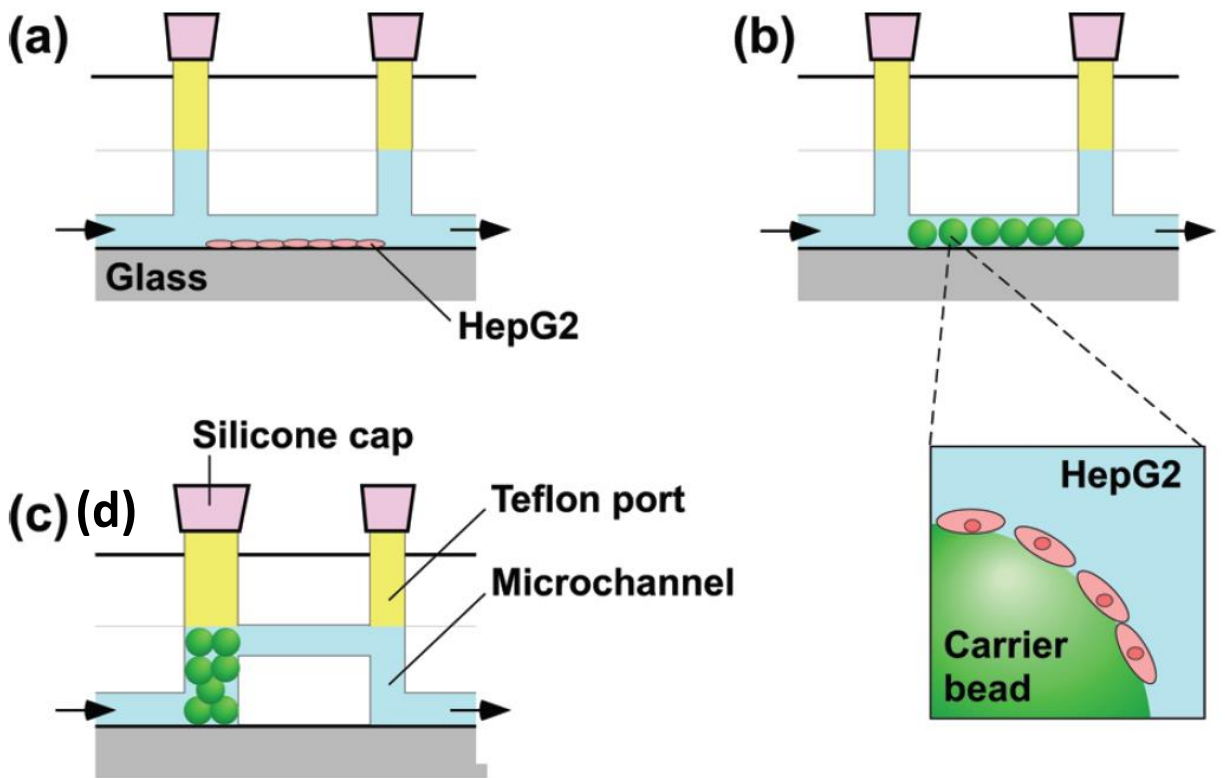


図4-10. マイクロ肝組織概念図

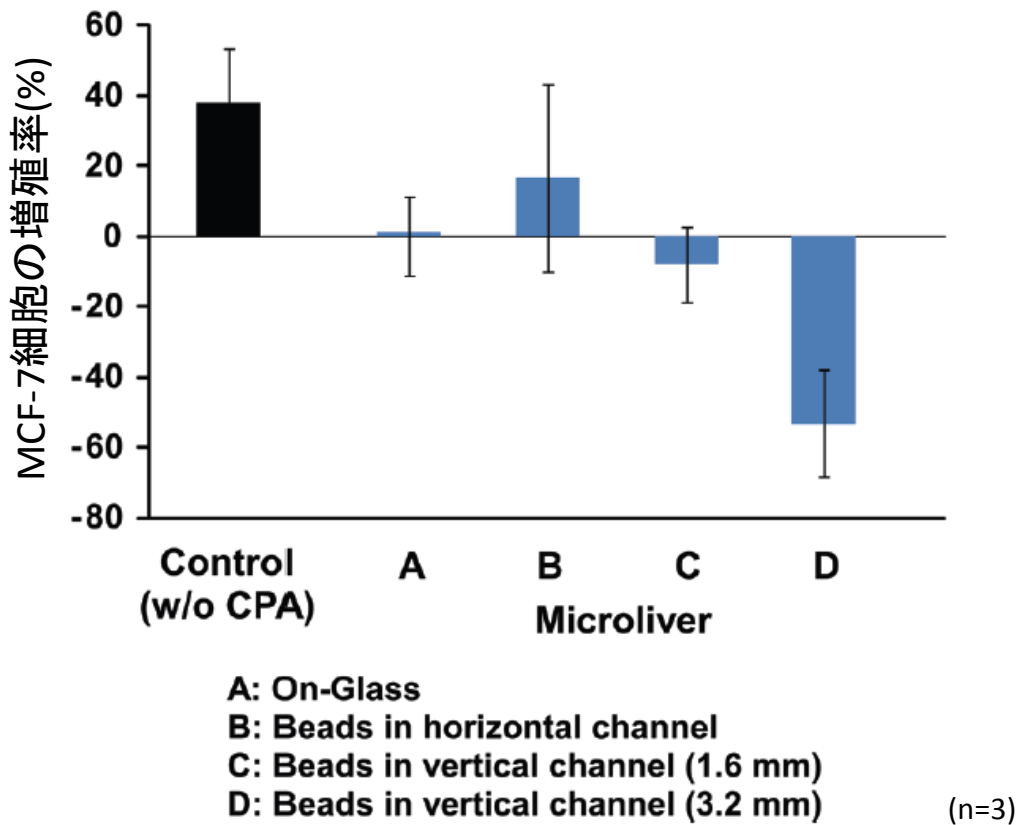


図4-11. マイクロ肝組織を複合したバイオアッセイ結果

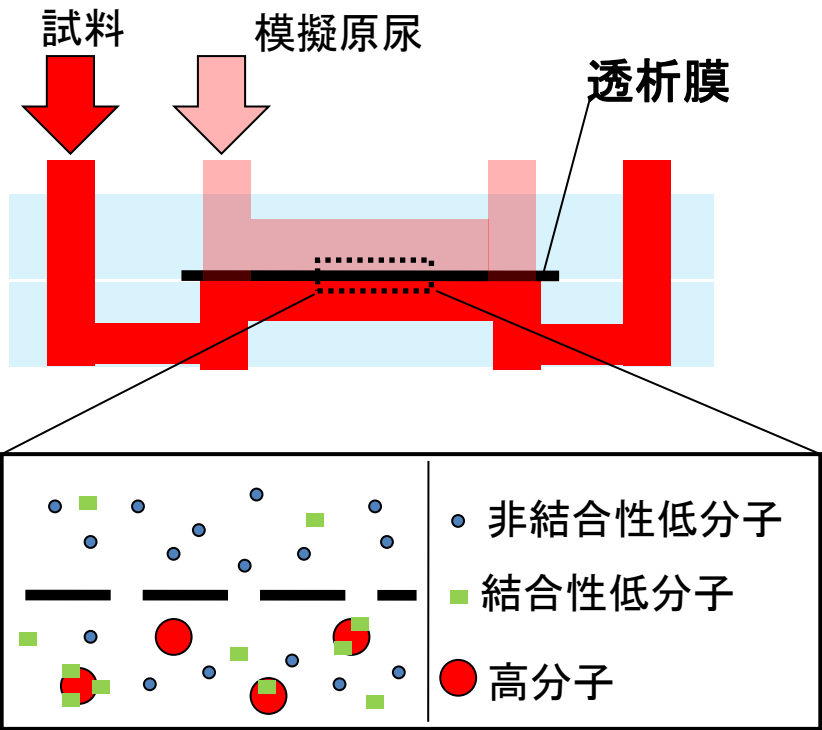


図4-12. マイクロ腎組織概念図

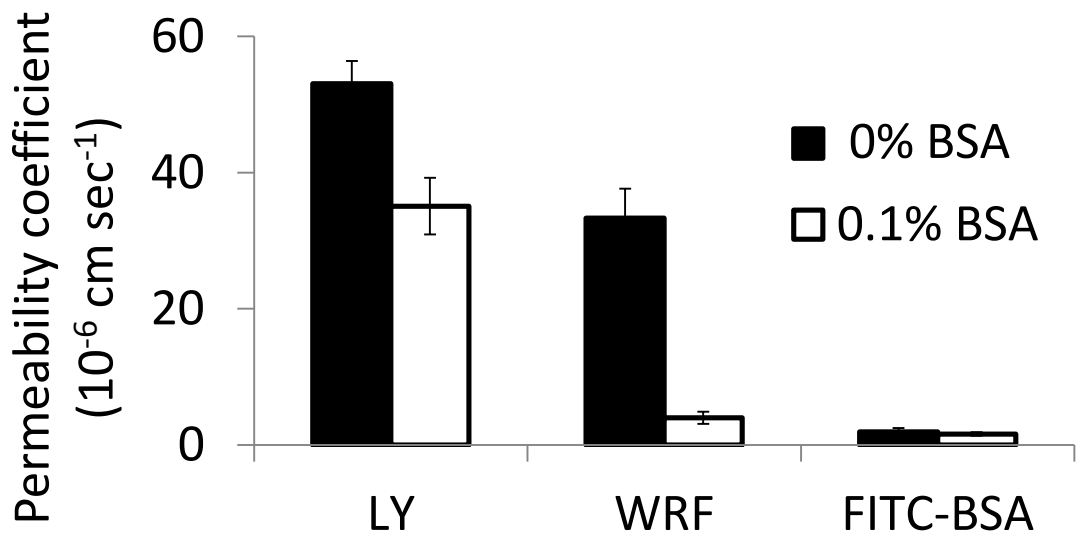


図4-13. 物質透過試験結果 (n=3)

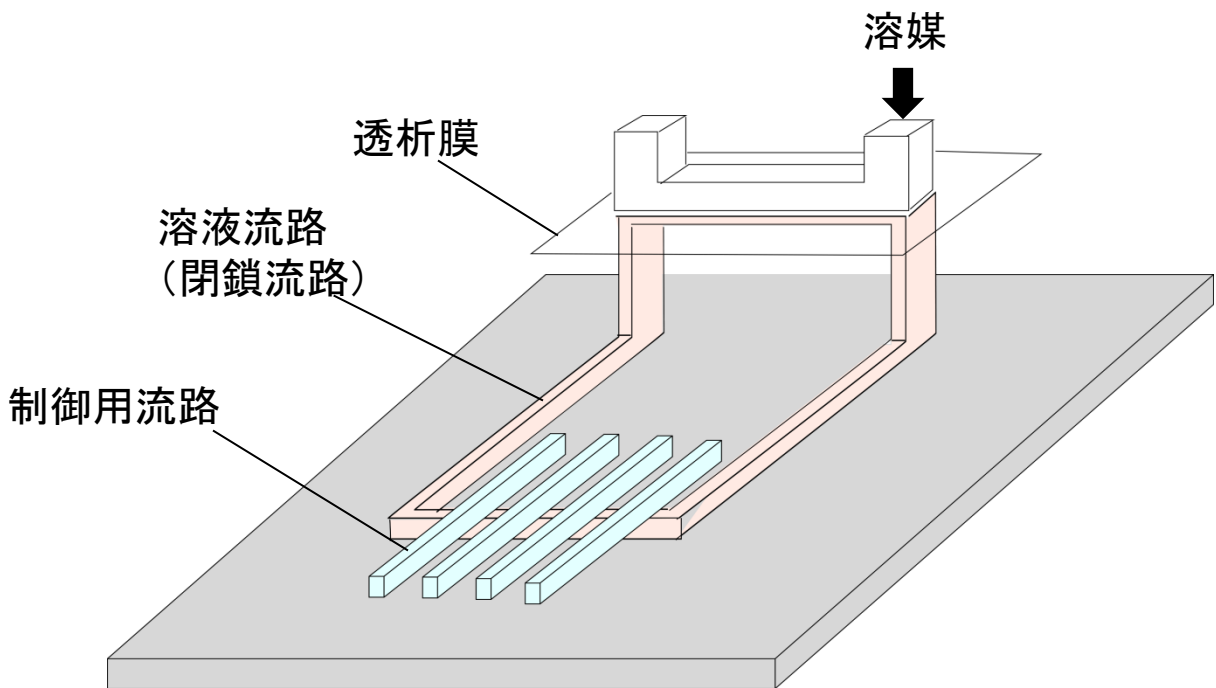


図 4-14 マイクロ腎組織-マイクロポンプチップ概念図

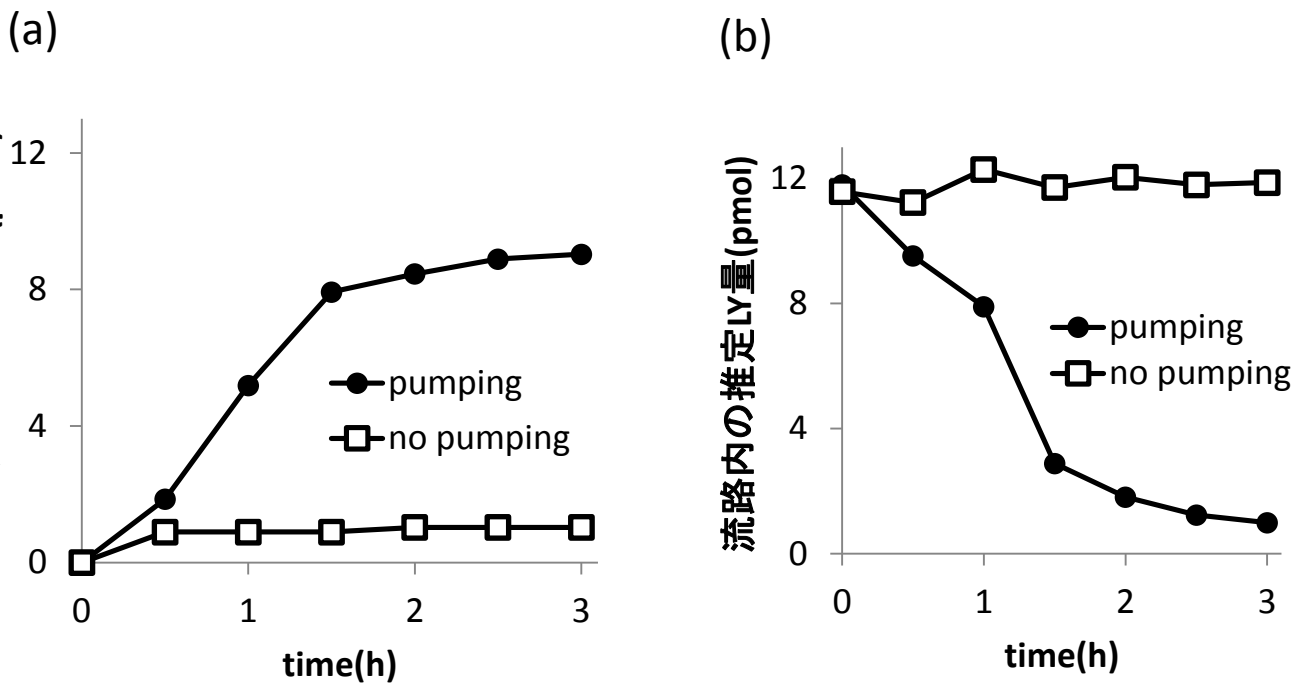


図 4-15 ポンプの駆動によるLYの経時的排出量と残量

(a) 上方流路へ排出されたLY量 (b) 流路内LY濃度から推定される残存LY量

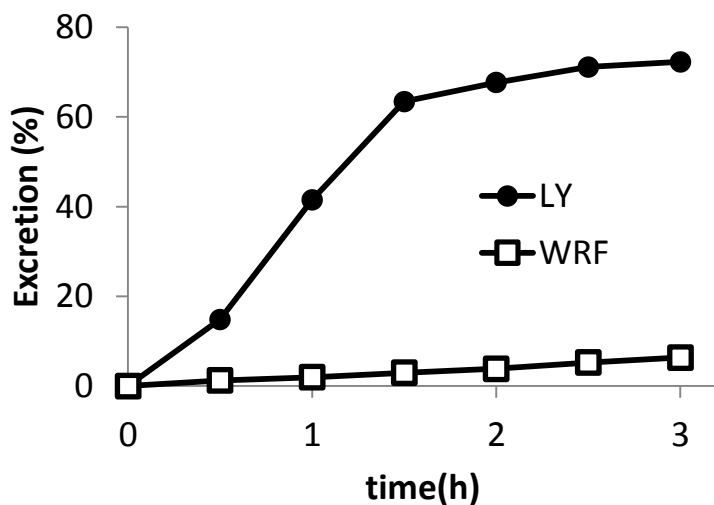


図 4-16 LYとWRFの経時的な排出

表4-1 消化組織の組成

試料溶液 (0.2 μl/min)	人工胃液 (0.057 μl/min)	中和液 (0.057 μl/min)	人工腸液 (0.057 μl/min)
Milli Q 水 試薬	50 mM HCl 0.05 M NaCl 0.2% ペプシン	50 mM NaOH 20 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM KH ₂ PO ₄ 24mM NaOH 1% パンクレアチン 0.3% 胆汁抽出物

模擬胃：流路徑1.6 mm (反応時間30分)

模擬十二指腸：流路徑3.2 mm(反応時間60分)

5 章 マイクロチップを用いた複合的バイオアッセイシステム

緒言

本章では4章で開発したマイクロ模擬臓器を組み合わせて、バイオアベイラビリティや生体内残留を考慮に入れた上でバイオアクティビティを評価することができるモデルを作製した。本研究で開発したシステムは以下の通りである。

・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップ

マイクロ腸上皮組織、マイクロ肝組織、マイクロ標的組織を直列に繋いだ複合的バイオアッセイシステムである。マイクロ腸上皮組織で物質の選択的な透過を行った後、吸収された物質に対してマイクロ肝組織にて代謝を行わせる。こうして得られた産物を標的に作用させ、生理活性を測定するシステムである。

・消化・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップ

上記のシステムへ、更にマイクロ消化管組織を搭載し、胃腸における物質の分解を考慮に入れた上で吸収・代謝・生理活性を測定するシステムである。

・循環・排出を考慮に入れたバイオアッセイチップ

マイクロ腎組織とマイクロポンプを組み合わせたシステム内へマイクロ標的組織を搭載したシステムである。閉鎖流路に予め試薬を添加しておき、ポンプによる駆動を行い、腎組織を通じてシステム外へ排出を行う。試薬の残留に応じて活性が変化する。

5-1 方法

5-1-1 吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイ

バイオアッセイは上方流路、下方流路に 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ の一定流速で培地を流しながら行った。上方流路には試験化合物を溶解させた培地を、下の流路には培地のみを流した。各組織の影響を調べるため、モデル細胞を培養していない対照実験系でも同様の実験を行った。すなわち、模擬腸上皮組織において Caco-2 細胞を培養していない実験系においては、細胞層による物質の選択的吸収が行われず、多孔質膜の穴を通過して物質が拡散により自由に透過する。模擬肝組織において HepG2 細胞を培養していない実験系においては、細胞の産出する代謝酵素が存在しないため、物質が代謝を受けることなく本来の状態ですべて組織を通過する。これら2つの条件の組み合わせにより4種類の実験系で実験を行った。すなわち、選択的な透過を行い代謝を行う系、選択的な透過を行い代謝を行わない系、拡散による自由な透過を行い代謝を行う系、拡散による自由な透過を行い代謝を行わない系である(図 5-1)。これらに加えて、サンプルである薬剤を導入しないコントロールでの実験を行い、一つの薬剤につき計5つの実験系でバイオアッセイを行った。試験化合物として、2 mM CPA、10 μM EPI、2 nM E2、3 μM IF をそれぞれ用いた。アッセイ終了後、LY の透過を確認して Caco-2 細胞層が機能していることを確認した。

また、TAM のエストロゲンアンタゴニストとしての活性評価を行った。標的細胞を常に E2 に曝露させるため、標的細胞の培養チャンバー入り口部に存在するポートに新規にシリンジポンプを接続し、20 nM E2 を含む培地を 0.02 ml/min で送液することで標的組織に直接 E2 を曝露した(図 5-2)。この状態で 10 μM TAM を含む培地を上方流路へ送液し、同様の実験を行った。

5-1-2 消化・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイ

マイクロ腸上皮組織の上流にマイクロ消化管組織を配置して実験を行った。試料として 2 mM CPA と 25 mM TGF をそれぞれ用いた。マイクロ消化組織による影響を評価するため、5-1-1 で行った 5 つの実験系それぞれに対し、人工消化液を流した場合と各消化液の代わりに PBS を流した場合の 2 種類を設定し、合計 10 通りのバイオアッセイを試みた。すなわち、消化・吸収・代謝の 3 つの過程に対し生体を模した場合と模さなかった場合をそれぞれ独立に考慮した 8

つの実験系に加え、薬剤を加えないコントロールの実験系にて消化の有無による影響を評価した。

5-1-3 循環・排出を考慮に入れたバイオアッセイ

MCF-7 細胞はバイオアッセイ開始の前日に導入を行い、接着させた。その後閉鎖流路を 100 μ M TESPA または 2 μ M DTX を含む培地で置換し、マイクロポンプを駆動させてバイオアッセイを行った。上方流路へは原尿を模した、FBS を含まない培地 (DMEM + 1 % NEAA + 抗生物質) をマイクロシリンジポンプで送液した。閉鎖流路の試料濃度を変化させない、すなわち排出が行われない対照実験として、上方流路に同濃度の薬剤および FBS を添加した培地を流してバイオアッセイを行った。この時透析膜を隔てて試料濃度は常時均衡しているため、閉鎖流路内部の物質濃度に変化は生じない。

結果と考察

5-2 吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップ

5-2-1 マイクロチップの設計

マイクロチップの概略図を図 5-3 に示す。マイクロ腸上皮組織の下層流路の下流にマイクロ肝組織を設置し、更にその下流にマイクロ標的組織を設置した。各組織のサイズは表 5-1 の通りである。マイクロチップの外観を図 5-4 に示す。

Caco-2 細胞および MCF-7 細胞は継代を行った後、細胞の増殖がコンフルエントな状態の 70% になったときトリプシンで処理を行い、細胞をシャーレよりはがした。そこにバイオアッセイ用に調製した培地(DMEM + 10% FBS + 1% NEAA + 抗生物質)を 2 ml 加えた。調製した懸濁液を Gel-Saver ピペットチップを用いてマイクロチップの導入部より導入した。Caco-2 細胞はバイオアッセイの 3 d 前に、MCF-7 細胞はバイオアッセイの前日に導入した。温度 37°C、湿度 100%、CO₂ 濃度 5% で培養を行った。培地交換は 48 h 後に行った。HepG2 細胞は Cytodex 上で 5 d 培養し、バイオアッセイ開始直前に垂直接路へ充填した。

5-2-2 バイオアッセイ

a) 抗癌剤

バイオアッセイの結果を図 5-5 に示す。CPA を薬剤として用いた実験では、薬剤を加えないコントロールの実験と比べて、細胞の数が減った。その抗癌活性は、HepG2 細胞を培養した系において特に高い活性を示し、HepG2 細胞のない実験系では小さな活性しか示さなかった。一方で Caco-2 細胞による活性への影響は HepG2 細胞の有無に関わらず、確認されなかった。このことはすなわち、CPA は肝臓で代謝されることで高い抗癌活性を発揮したということであり、また Caco-2 細胞の層をよく透過することが出来たということである。このことは、CPA がプロドラッグであり、経口投与で用いられるという既知の性状と合致する。EPI を薬剤として用いた実験では、やはり薬剤を加えないコントロールの実験と比べて、細胞の数が減った。その抗癌活性は、Caco-2 細胞を培養しない系において特に高い活性を示し、Caco-2 細胞を培養した実験系ではあまり活性を示さなかった。一方で HepG2 細胞による活性への影響は Caco-2 細胞の有無に関わらず、あまり確認されなかった。これは EPI が Caco-2 細胞の層を透過できず、代謝を受けていない本来の状態において抗癌活性を有しているのだ

と考えられる。これは EPI が通常静脈注射により投与されるという既知の性状と合致する。

b) エストロゲン様活性物質

バイオアッセイ結果を図 5-6 に示す。エストロゲン様活性物質である E2 と IF を試料として使用した場合、試料を加えないコントロールの実験系と比べて、細胞の数が増加した。活性強度の差はあるものの、2種の試料は同様の傾向を示した。HepG2 細胞を培養しない実験系においては増殖が促進されたのに対し、HepG2 細胞を培養した実験系においては増殖促進が見られなかった。Caco-2 細胞を培養している実験系においては、培養していない実験系よりも増殖促進効果が大きいという結果となった。これは、エストロゲン様活性物質は HepG2 細胞の代謝により失活していると考えられ、Caco-2 細胞の細胞層を良く透過していると考えられる。

c) エストロゲンアンタゴニスト

バイオアッセイ結果を図 5-7 に示す。TAM 単体でバイオアッセイを行うと、通常の状態ではコントロールのアッセイと比べて大差は見られなかった。つまり、TAM には強い抗癌活性やエストロゲン様活性がないのではないかということが示唆された。しかし、標的細胞を E2 に晒した条件ではエストロゲンアンタゴニスト活性が確認された。すなわち、TAM を加えずにバイオアッセイを行うと E2 の増殖促進効果が如実に確認できるのに対し、TAM を加えるとその効果が抑えられる。アンタゴニスト活性に対する、Caco-2 および HepG2 細胞の有無による影響は確認されなかった。これは TAM が Caco-2 細胞の細胞層を良く透過し、HepG2 細胞の代謝によって活性に影響が出ていないということが考えられる。

5-3 消化・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップ

5-3-1 マイクロチップの設計

マイクロチップの概略図と外観を図 5-8 に示す。マイクロ腸上皮組織の上流にマイクロ消化管組織を配置し、それ以降は 5-2 と同様である。本システムでは 6 本のシリンジを用いて実験を行った。溶液の組成・流速および消化管組織各部位のサイズは表 5-2 にまとめて示す。細胞の導入・培養も 5-1-1 の手順に従って行った。

まずはマイクロチップの形状を検討した。4-3 で検討したマイクロ消化管組織と 5-2 で検討したバイオアッセイチップを接続して、消化、吸収、代謝を考慮に入れたマイクロバイオアッセイチップを設計、試作した。このとき両者をただ接続するだけでは垂直流路の数が多くなりすぎ、チップ作製が困難となった。そこで、消化実験の時には垂直流路として作製していた模擬十二指腸を、流路内容積が変わらないようにしながら水平流路に変更した。

次に実験条件の検討を行った。はじめにマイクロ消化組織とマイクロ腸上皮組織の相互作用を評価した。マイクロ腸上皮組織は膜上にコンフルエントな細胞層を形成しており、わずかな間隙があるだけでも正確な物質透過は測定できない。本システムではマイクロ腸上皮組織の上流にマイクロ消化組織があり、そこを通過して流れてくる溶液には消化酵素や胆汁などの細胞にとって有害な物質が含まれている。また、浸透圧などを調整していないため、細胞培養に不適な条件である可能性がある。これらによるストレスが Caco-2 細胞の物質透過に悪影響を与えないかどうかを調べる必要があった。マイクロ消化組織の 4 本のシリンジに加え、マイクロ腸上皮組織の入り口にシリンジを設置し、検討を行った。

流速について検討を行った。マイクロ消化組織を通るフローに対してマイクロ腸上皮組織入り口へのフローが小さすぎた場合、培地量が不足することにより Caco-2 細胞がダメージを受けてしまった。逆に大きすぎる場合、試薬の希釈率が大きくなるため試料原液の濃度を上げねばならない。これらを踏まえて検討を行ったが、再現性良く Caco-2 細胞のシングルレイヤーを培養し続けることは難しかった。そこで、試料を DMEM に溶かしてサンプルとして導入する方法を試みた。細胞培養を行う際に DMEM へ添加する FBS にはトリプシンインヒビターなどの消化酵素阻害タンパク質が含まれる上、そもそも消化の過程を経ることで血清中のタンパク質は分解されてしまう。そこで試料を溶かす DMEM には FBS を添加せず、マイクロ消化組織を終えたマイク

口腸上皮の入り口にて FBS 濃度の高い培地を導入することで培地と血清の割合を調整しようと考えた。ここで問題となるのは試料溶液に DMEM を用いることによる模擬胃での pH 変動である。DMEM には pH 緩衝作用を持つ炭酸水素ナトリウムが含まれているため、4-3-1 にて実現した pH 環境を実現することはできない。そこで再度人工胃液と中和液の条件を検討した。以上の点を踏まえ、模擬胃・模擬十二指腸における消化と Caco-2 細胞の培養を同時に満たす条件を探した。Caco-2 細胞の培養具合はカルセイン AM を用いた染色による観察と、LY の透過を測定することにより評価した。この条件下で、Caco-2 細胞層は平均して 3 d 程度の培養に耐えることができた。この条件では腸腔に見立てた上方流路の流速はメンブレン上にて 0.57 $\mu\text{l}/\text{min}$ 程度となった。これは 5-1 のバイオアッセイチップの流速 (0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$) より若干速い。

次に血管に見立てた下方流路の流速を決定することにした。下方流路流速の条件としては、マイクロ腸上皮組織により吸収された試薬の濃度が薄まりすぎない程度に遅く、HepG2 細胞や MCF-7 細胞が貧栄養に晒されない程度に速いことなどが挙げられる。5-1 で用いた 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ という速度はこれらの条件を満たしたため、下方流路の流速は 0.4 $\mu\text{l}/\text{min}$ にて実験を行うこととした。

5-3-2 バイオアッセイ

バイオアッセイの結果を図 5-9 に示す。CPA に関しては、消化を行わなかった場合と消化を行った場合とで、生理活性に大きな差は見られなかった。すなわち、消化過程が CPA の活性に影響を与えなかったということであり、この薬剤は消化過程に強い薬剤であるということが示唆された。その他の性質については 3 章で考察したものと同等の結果が得られた。すなわち、マイクロ腸上皮組織の細胞層を通りぬけて作用を示すことができ、肝組織にて代謝された後に高い抗癌活性を示すということである。一方で TGF に関しては、消化実験で CPA と異なる結果が得られた。消化過程を行わなかった場合の TGF はプロドラッグの傾向を示した。マイクロ腸上皮組織による選択的透過を行わせた系でも抗癌活性を有するので、マイクロ腸上皮組織をよく透過する薬剤だと考えられ、肝組織にて代謝を行わせることで高い抗癌活性を示すようになるものだと考えられる。しかしながら TGF は、消化過程を経た場合吸収・代謝過程の有無に関係なく全ての実験条件で抗癌活性を失った。この結果から TGF が消化過程に弱い薬剤であるということが示唆され、それは強酸に弱いという TGF の既知性状と合致した。

5-4 経時的な排出を考慮に入れたバイオアッセイチップ

5-4-1 マイクロチップの設計

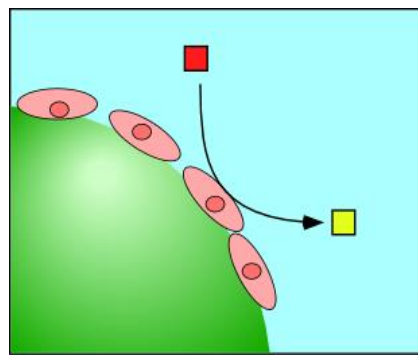
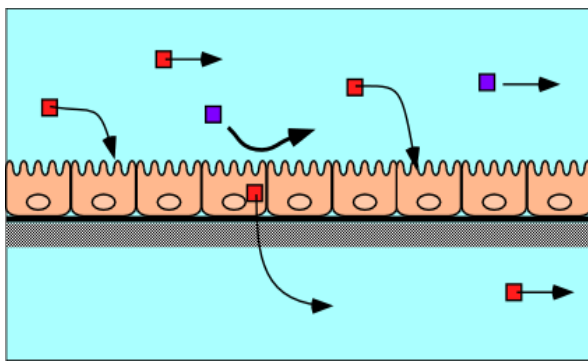
マイクロチップの概略図を図 5-10 に示す。4-6 の循環・排出を行うマイクロチップの閉鎖流路の一部を細胞培養チャンバーとした。閉鎖流路へ溶液を充填するための導入ポートの他に、チャンバーの両端にも細胞導入用の導入ポートを設置した。これも閉鎖流路へのコンタミネーションを防ぐため、直上に設置せずチャンバーから離れた場所に設置した。マイクロチップ外観を図 5-11 に示す。培養チャンバーは 3-1 と同様にフィブロンectinコートを行った。

4-6 のスケールでは MCF-7 細胞は流路に接着しなかった。これは流路のスケールが細胞に対して小さすぎたことが原因だと考えられ、栄養が枯渇したのだと考えられた。そこで培養チャンバーおよび閉鎖流路のスケールを大きくしようと試みた。しかし閉鎖流路、特にマイクロポンプの部分を大きくしすぎると、制御流路により溶液流路が十分に潰れず、溶液のフローを妨げることになる。また、チャンバー部やポンプ部のみをスケールアップしたところ、スケールアップした箇所の特異的に気泡が発生してしまった。そのため流路全体をスケールアップするのが適切だと考え、最適化を行った。最終的に閉鎖流路の幅は 0.3 mm、高さは 0.1 mm とした。閉鎖流路は水平流路が全長 $50 \times 0.3 \times 0.1$ mm ($L \times W \times H$)、中層シートを貫く垂直流路は直径 0.25×3 mm ($i.d. \times L$) が 2 本である。その他、垂直流路の設置箇所に 1×0.1 mm ($i.d. \times L$) のジョイントを 4 箇所設置した。閉鎖流路の容積はこれらの合計値の約 2.9 μ L である。この条件ではポンプの流速はおよそ 25 nL/min となった。

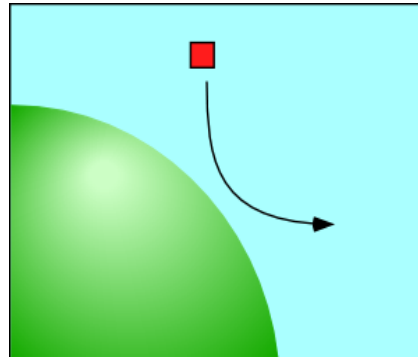
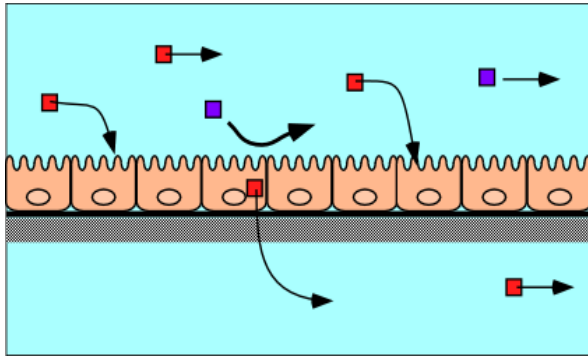
5-4-2 バイオアッセイ

バイオアッセイの結果を図 5-12 に示す。薬剤を入れずに実験を行ったコントロールの実験においてもアッセイ後に 15%程度細胞が死亡した。これは本システムの狭い培養チャンバーや、脈流によるストレスが原因だと考えられる。抗癌剤を添加して行ったバイオアッセイでは、コントロールと比較して細胞の死亡率が増加した。DTX は上方流路にフリーの培地を流して排出を行った場合と、上方流路に薬剤を入れていた場合とでほぼ同程度の抗癌活性を示し、アッセイ期間で約 30~40%の細胞が死亡した。一方で TESP A は排出を行った場合死亡率は 26%程度であったのに対し、排出を行わなかった場合はおよそ倍の 52%程度

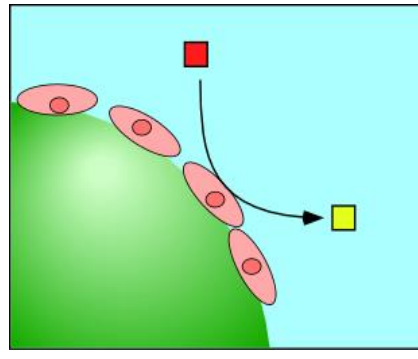
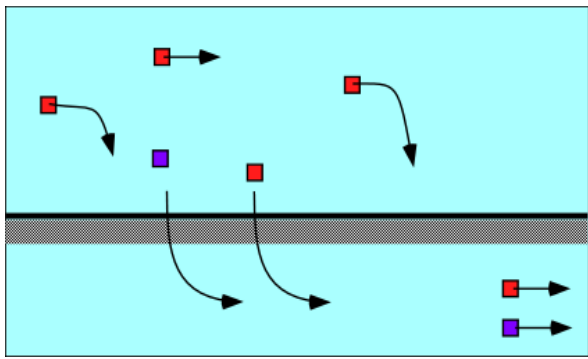
が死亡した。この結果は DTX と TESPA の血漿タンパク質結合率を反映していると考えられる。すなわち、DTX は 90%以上が血漿中でタンパク質と結合しており、WRF と同様に透析がされにくい状態にあると考えられる。そのためアッセイ期間中も閉鎖流路からクリアされず、持続的に効果を発揮していたのだと示唆される。一方 TESPA は結合率が 10%程度であり、多くが透析膜を通過出来る状態にあると考えられる。本システムはおよそ 2 h で閉鎖流路の溶液が一巡し、溶質のほとんどが排出される。そのため TESPA の場合はアッセイ時間のほとんどを抗癌剤フリーの状態に培養されており、高い抗癌活性が示されなかったのだと考えられる。これらの結果は抗癌剤の性状と合致しており、本システムが生体残留性を考慮に入れたプレリミナリーなバイオアッセイに有用であることが示唆された。



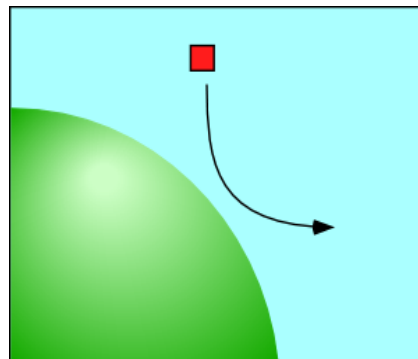
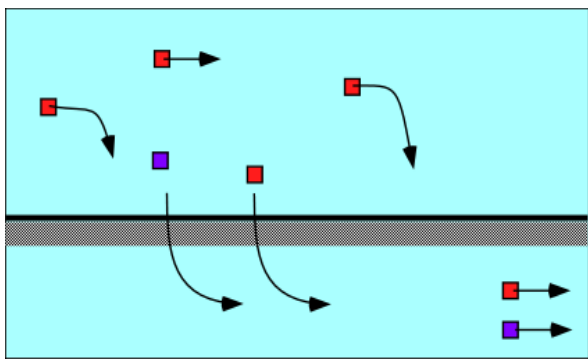
Caco(+)
 選択吸収
 +
 Hep(+)
 代謝



Caco(+)
 選択吸収
 +
 Hep(-)
 不代謝



Caco(-)
 拡散
 +
 Hep(+)
 代謝



Caco(-)
 拡散
 +
 Hep(-)
 不代謝

図 5-1 吸収・代謝の実験系

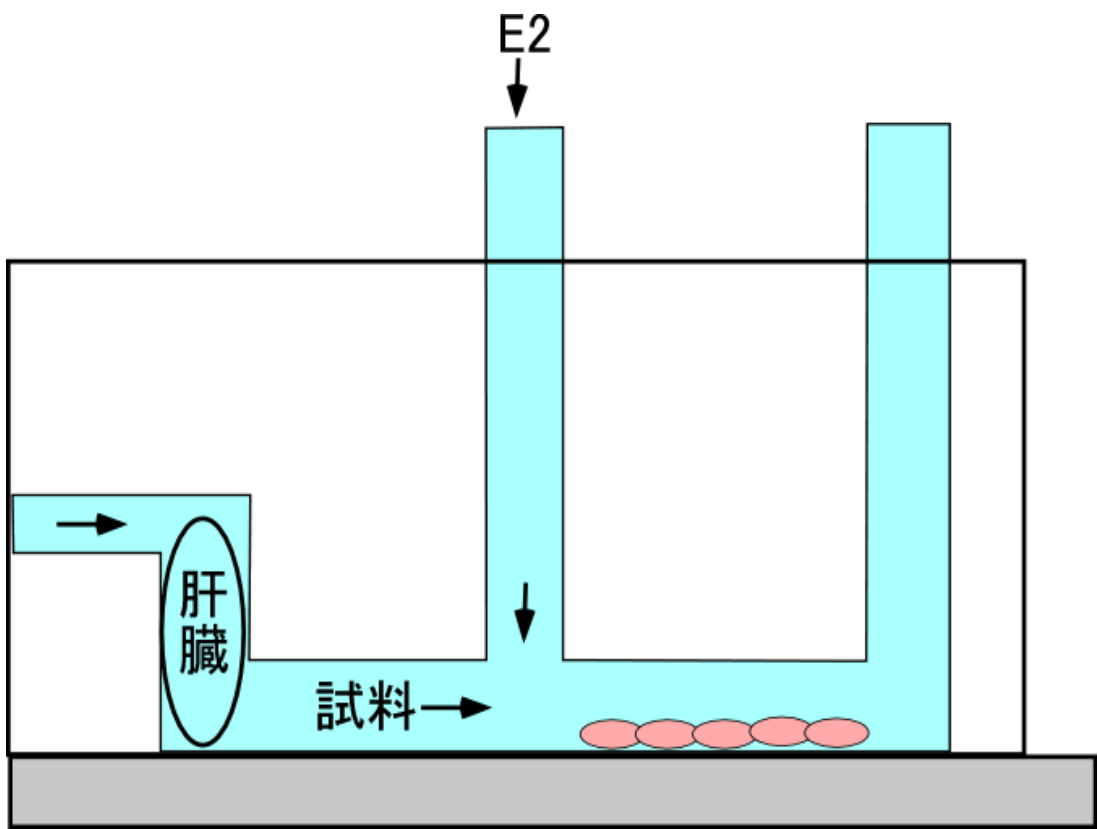


図 5-2 エストロゲンアンタゴニストバイオアッセイ概念図

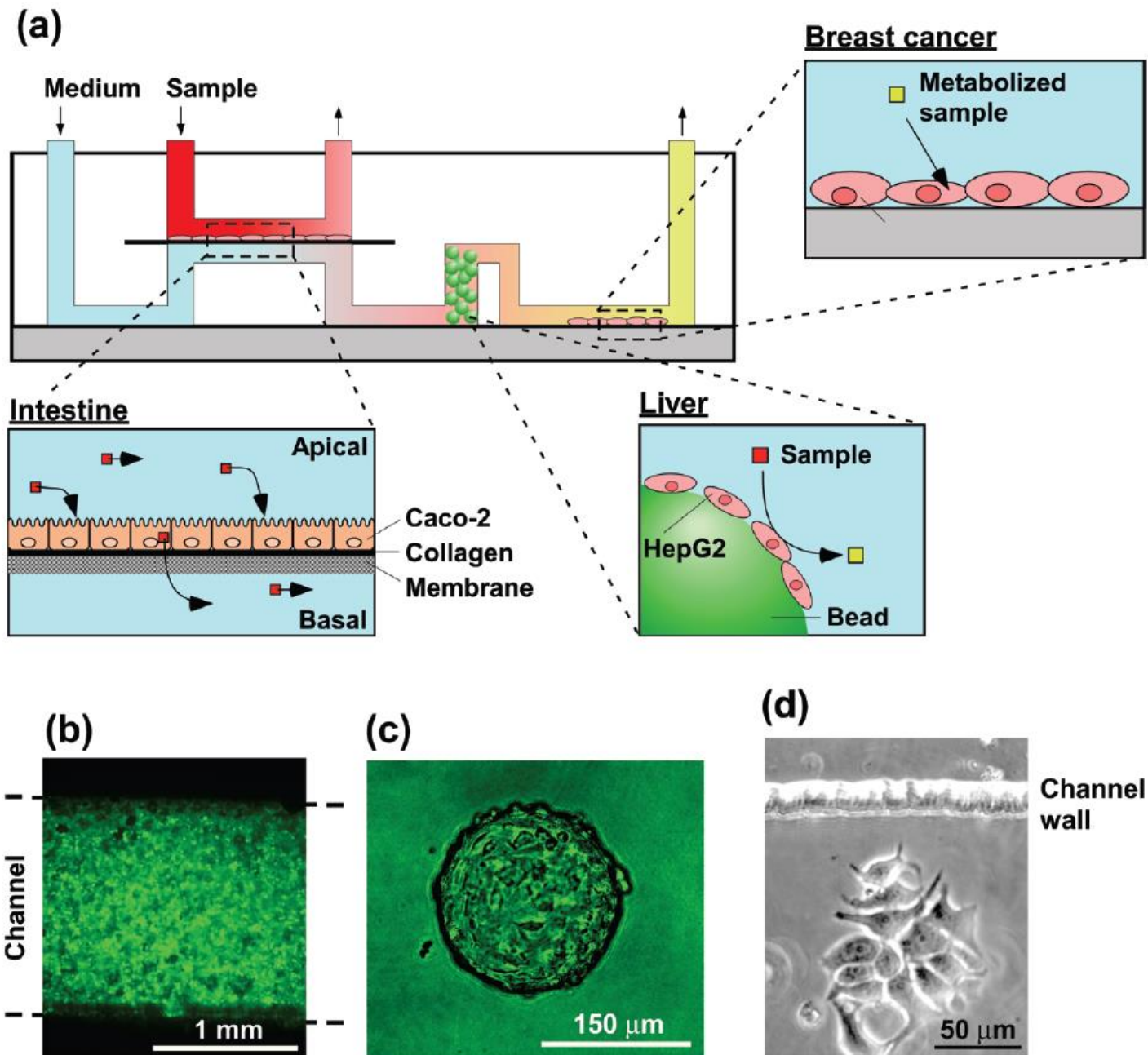


図5-3 吸収と代謝を考慮したバイオアッセイシステム模式図

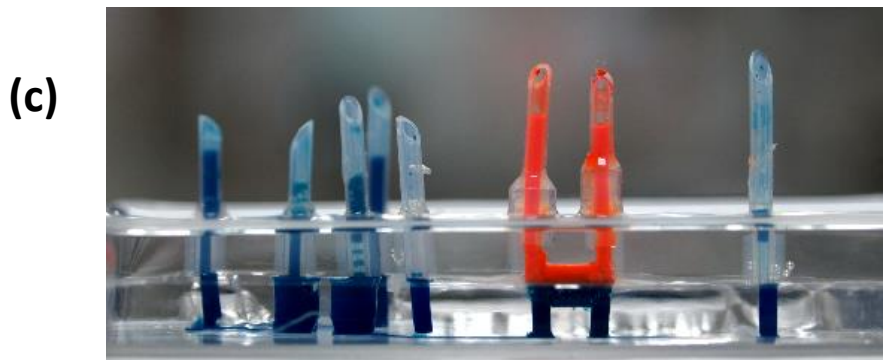
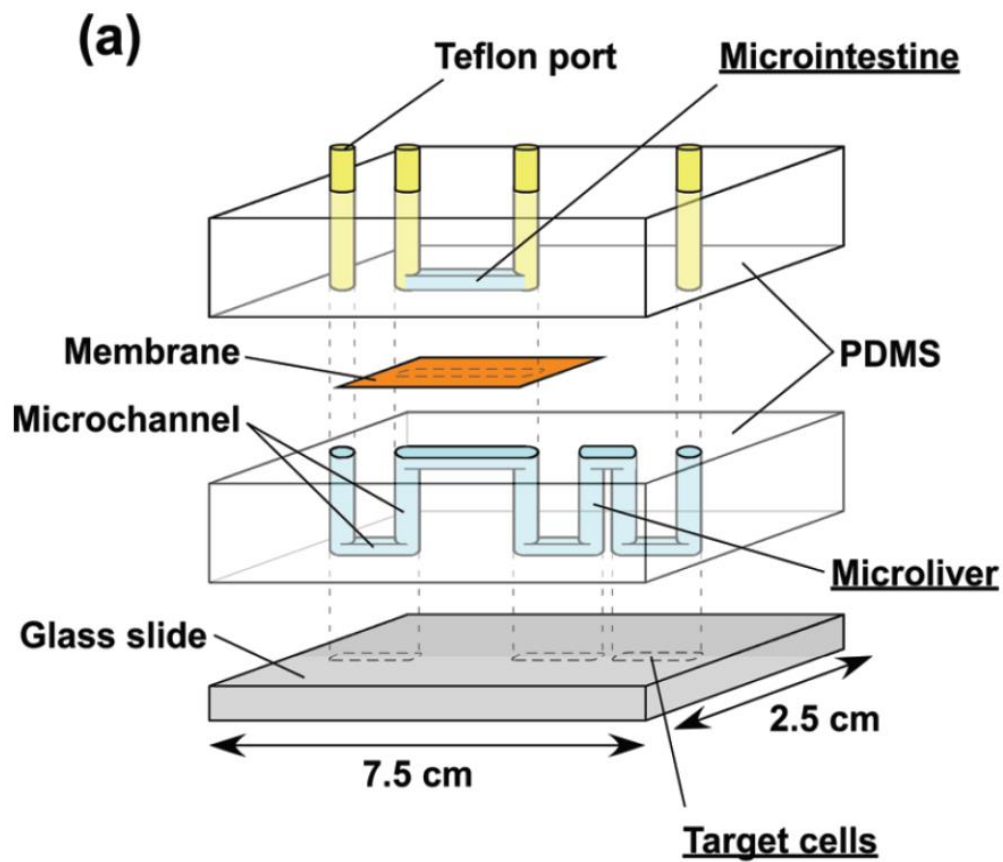


図 5-4 マイクロチップ外観

a) チップ作製の模式図 b) 俯瞰写真 c) 側面写真
 上方流路に赤の、下方流路に青の液体を充填した。

標的細胞の増殖・減少率

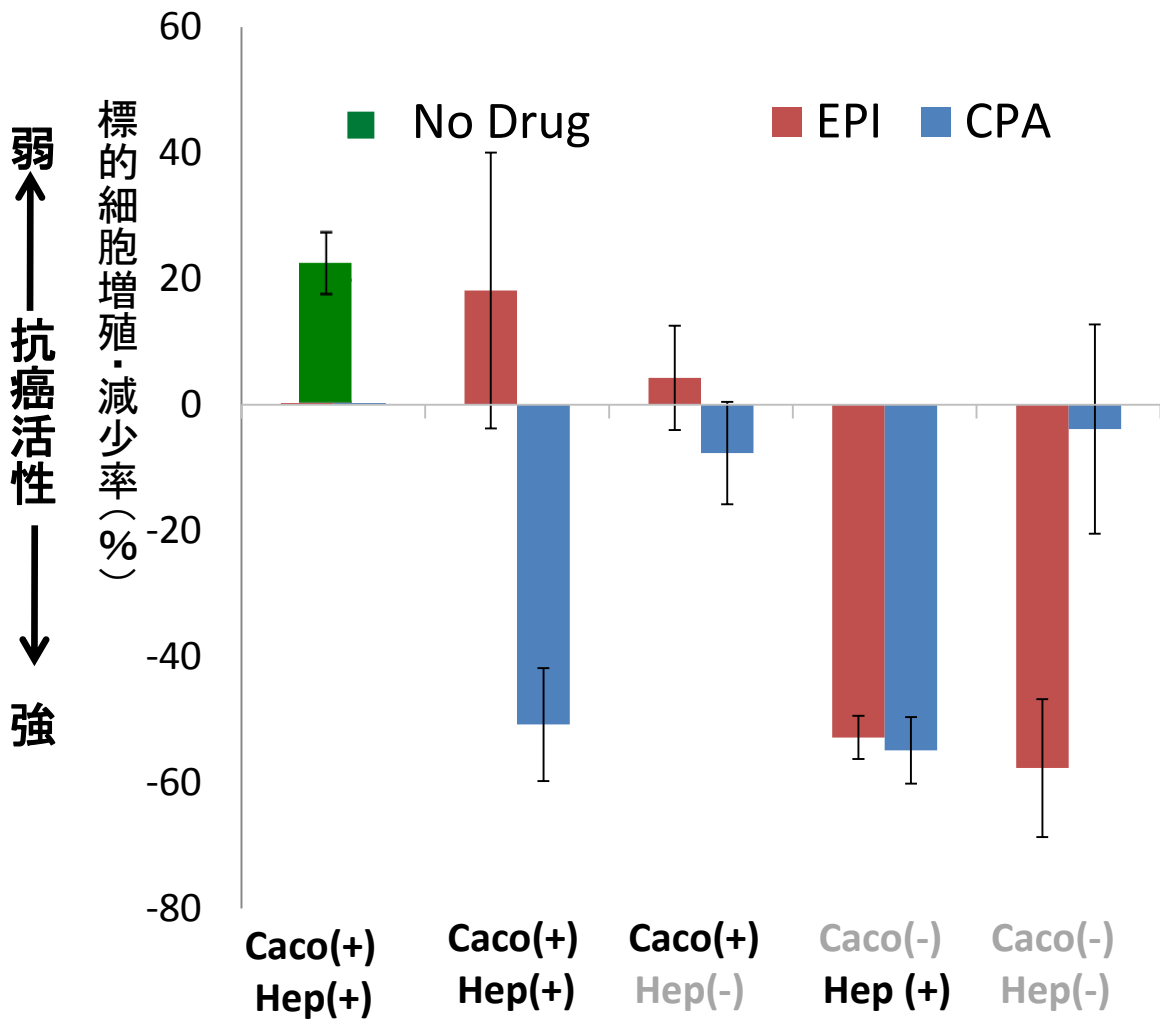


図 5-5 抗癌剤のバイオアッセイ結果 (n=3)

標的細胞の増殖率

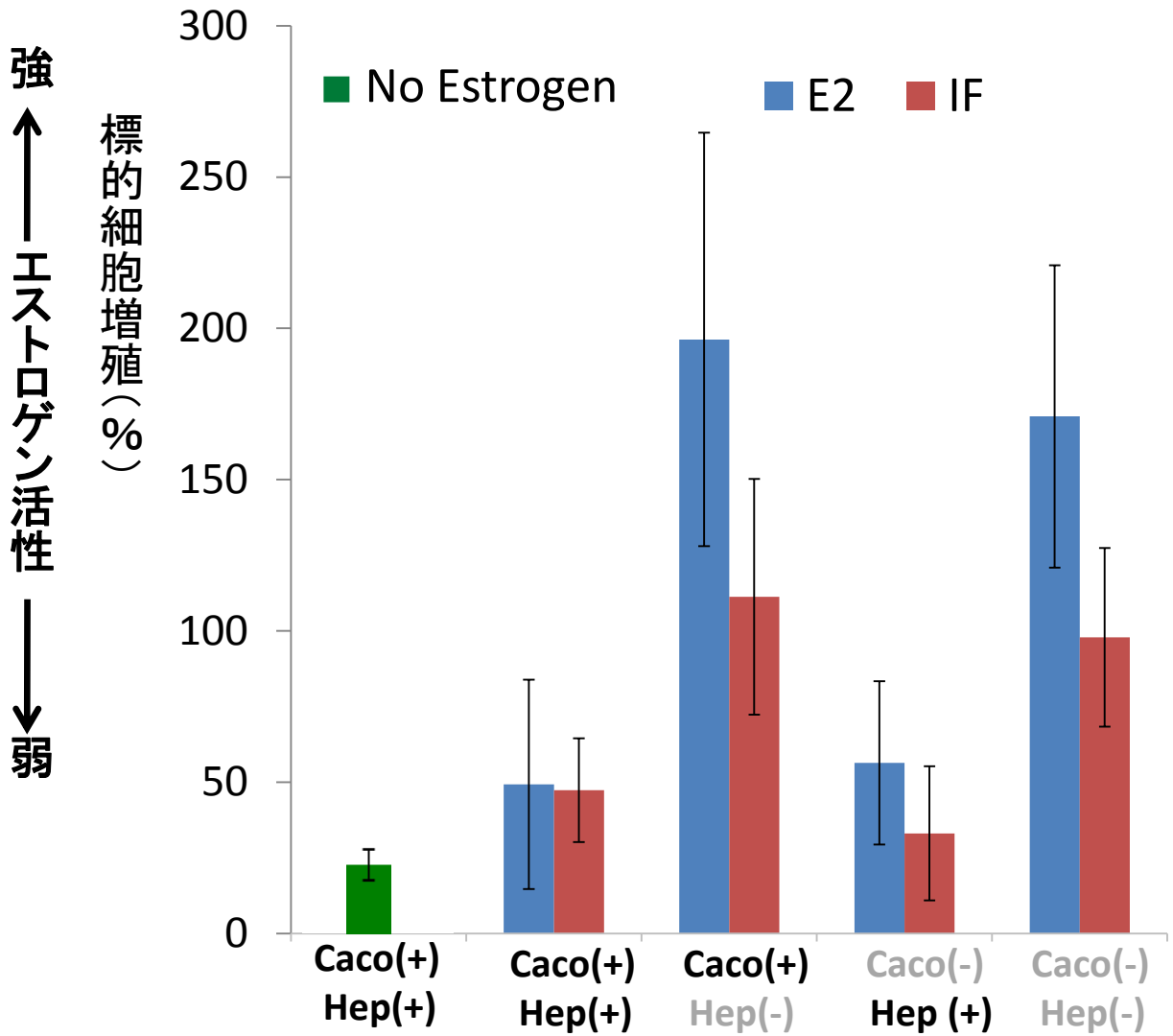


図 5-6 エストロゲン様活性物質のバイオアッセイ結果 (n=3)

標的細胞の増殖・減少率

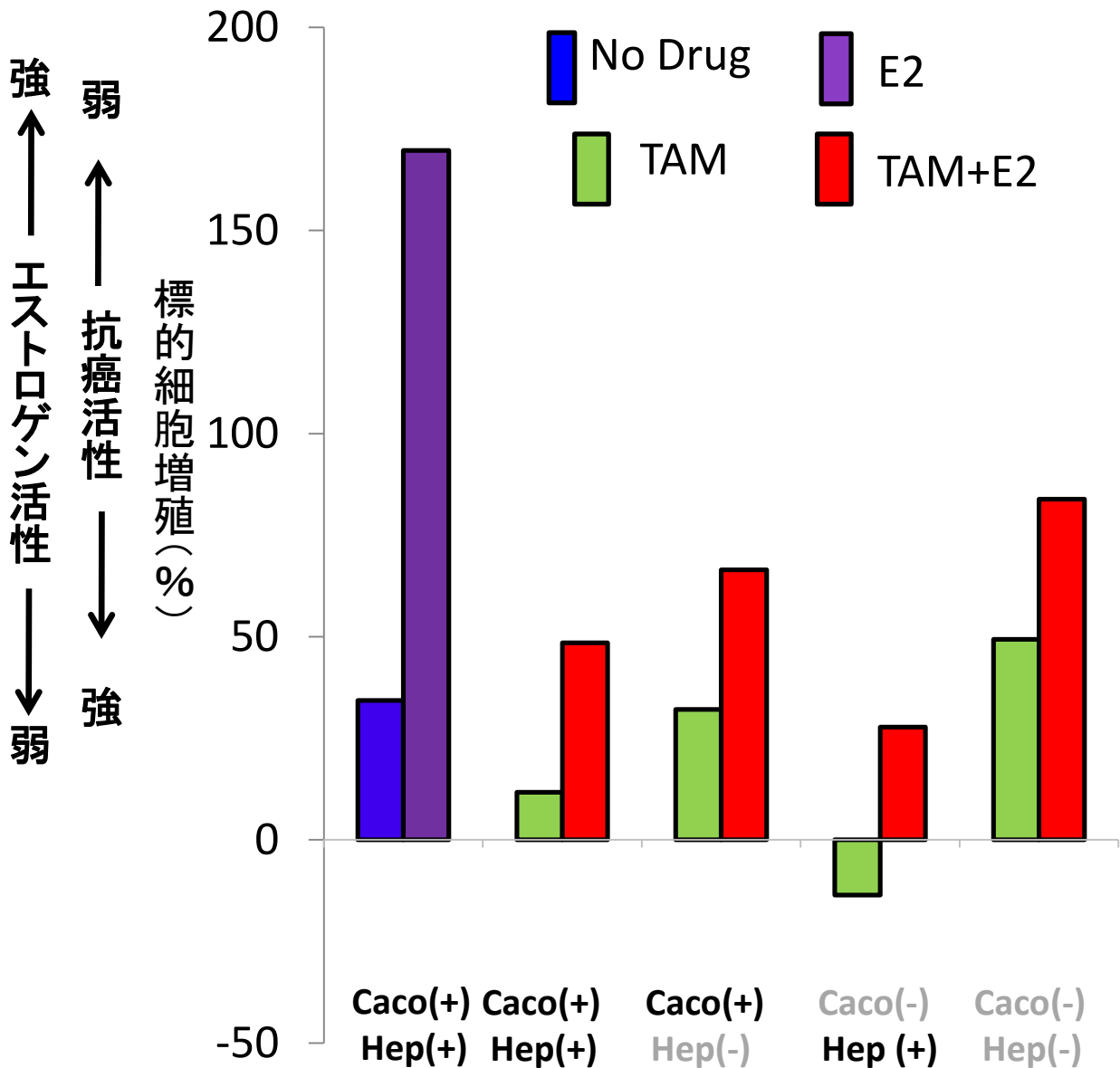
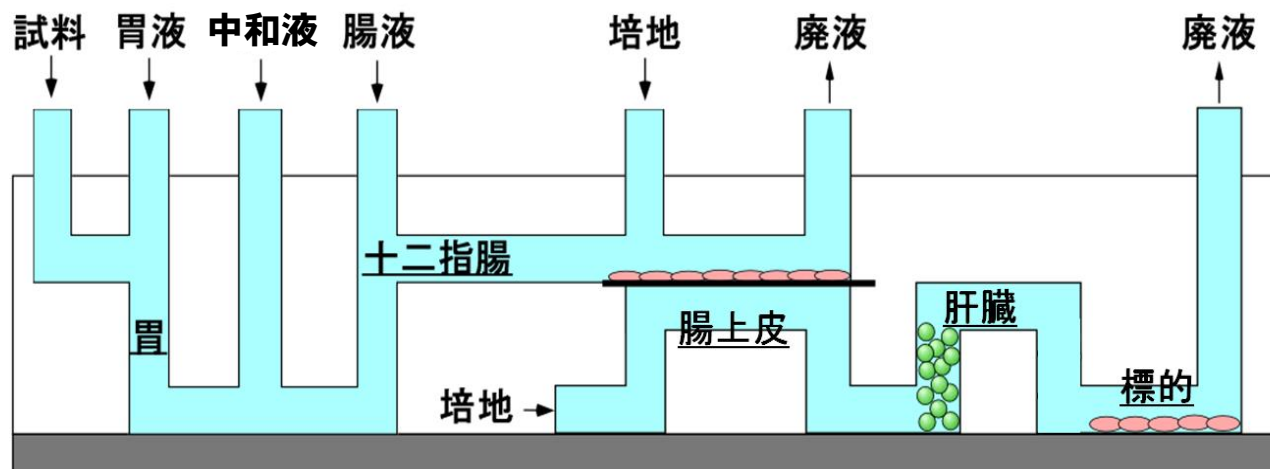


図 5-7 エストロゲンアンタゴニストのバイオアッセイ結果

(a)



(b)

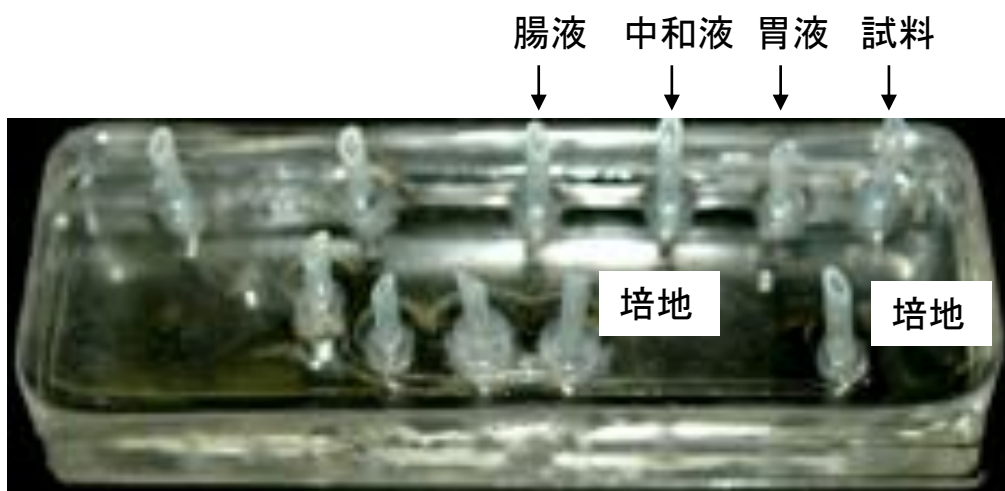
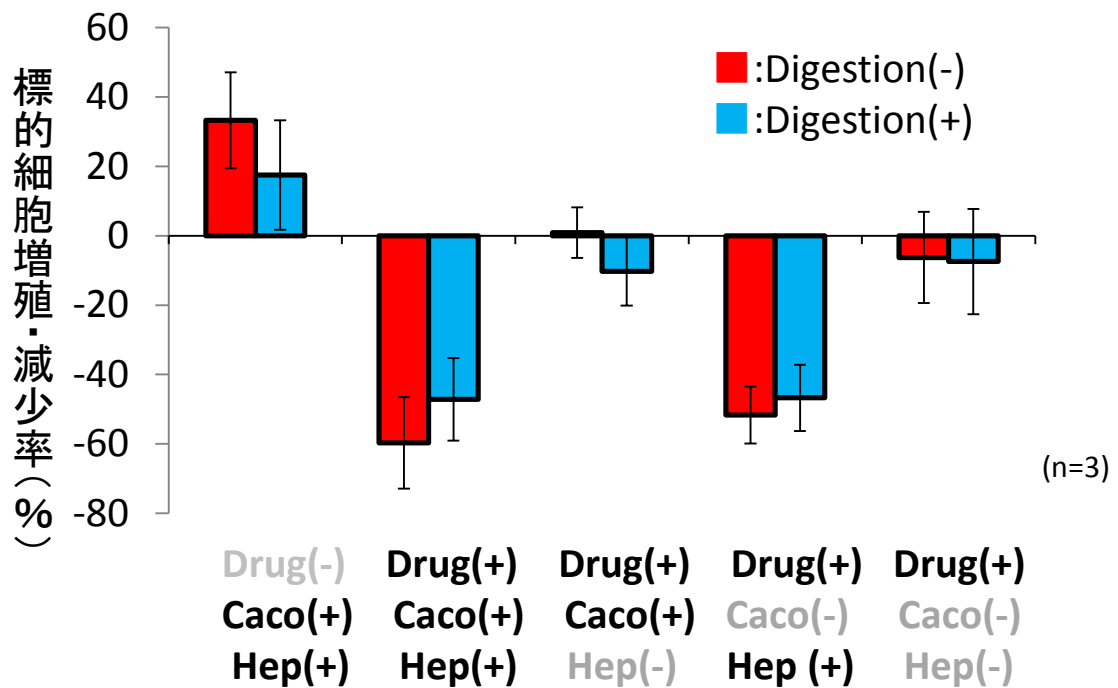


図5-8消化、吸収、代謝を考慮したバイオアッセイシステム
(a)模式図 (b)外観

CPAのバイオアッセイ結果



TGFのバイオアッセイ結果

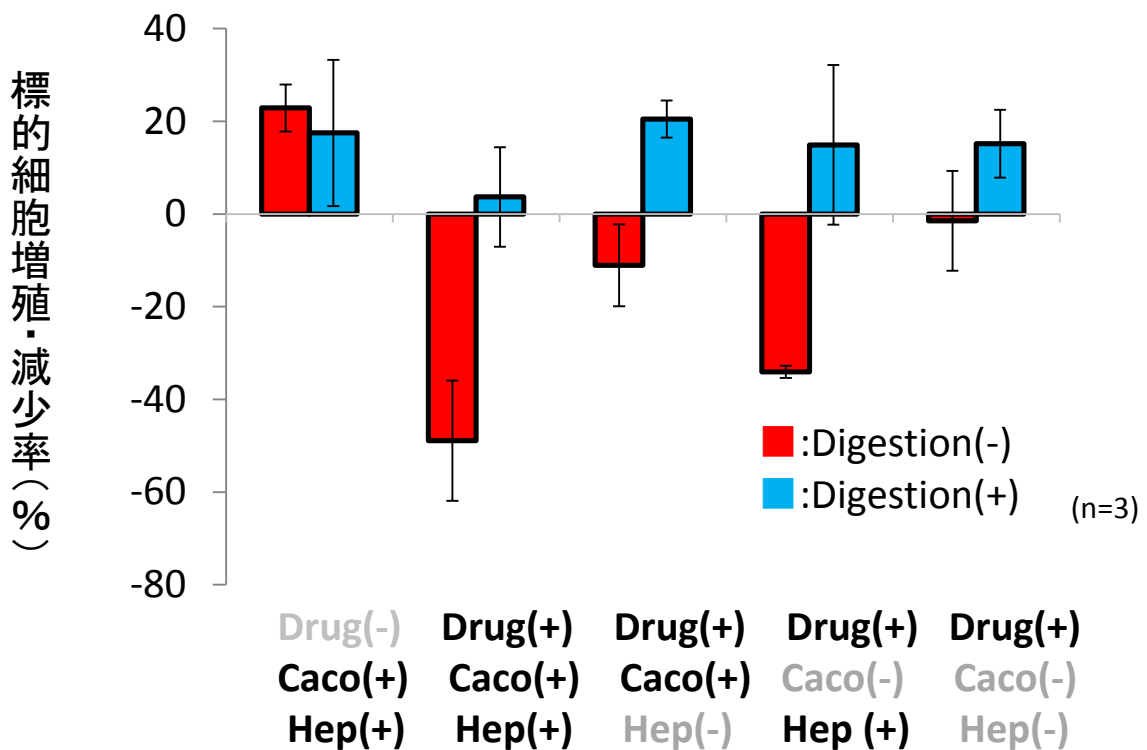


図 5-9 消化・吸収・代謝を考慮したバイオアッセイ結果

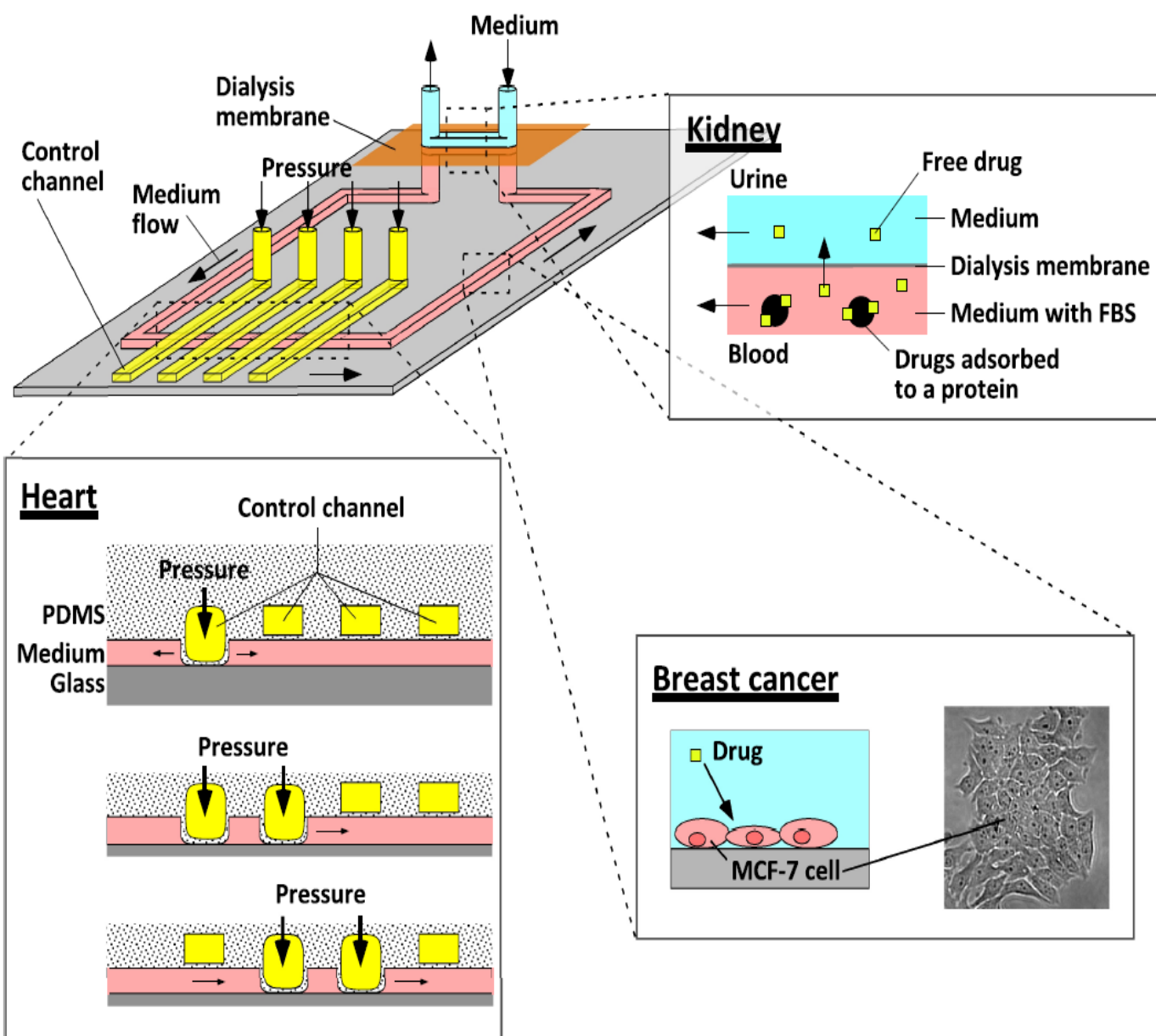


図 5-10 経時的な排出を考慮したバイオアッセイシステム 模式図

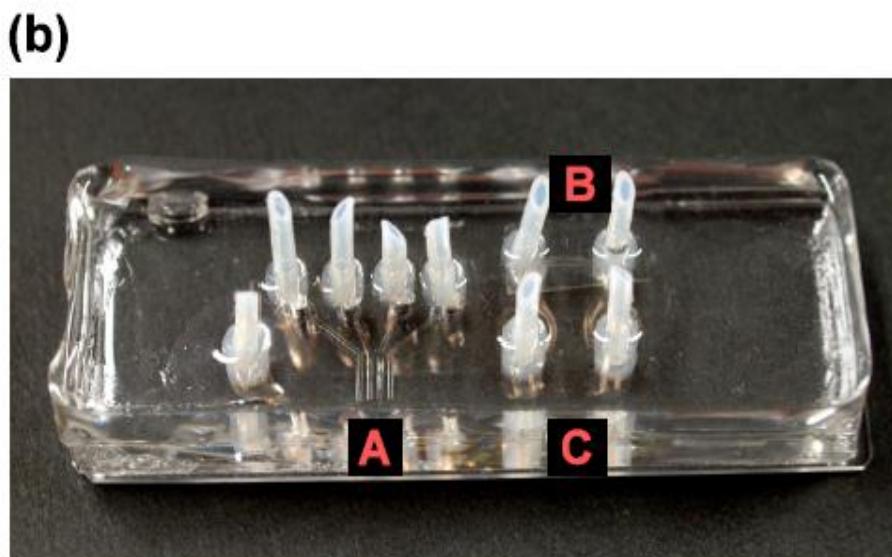
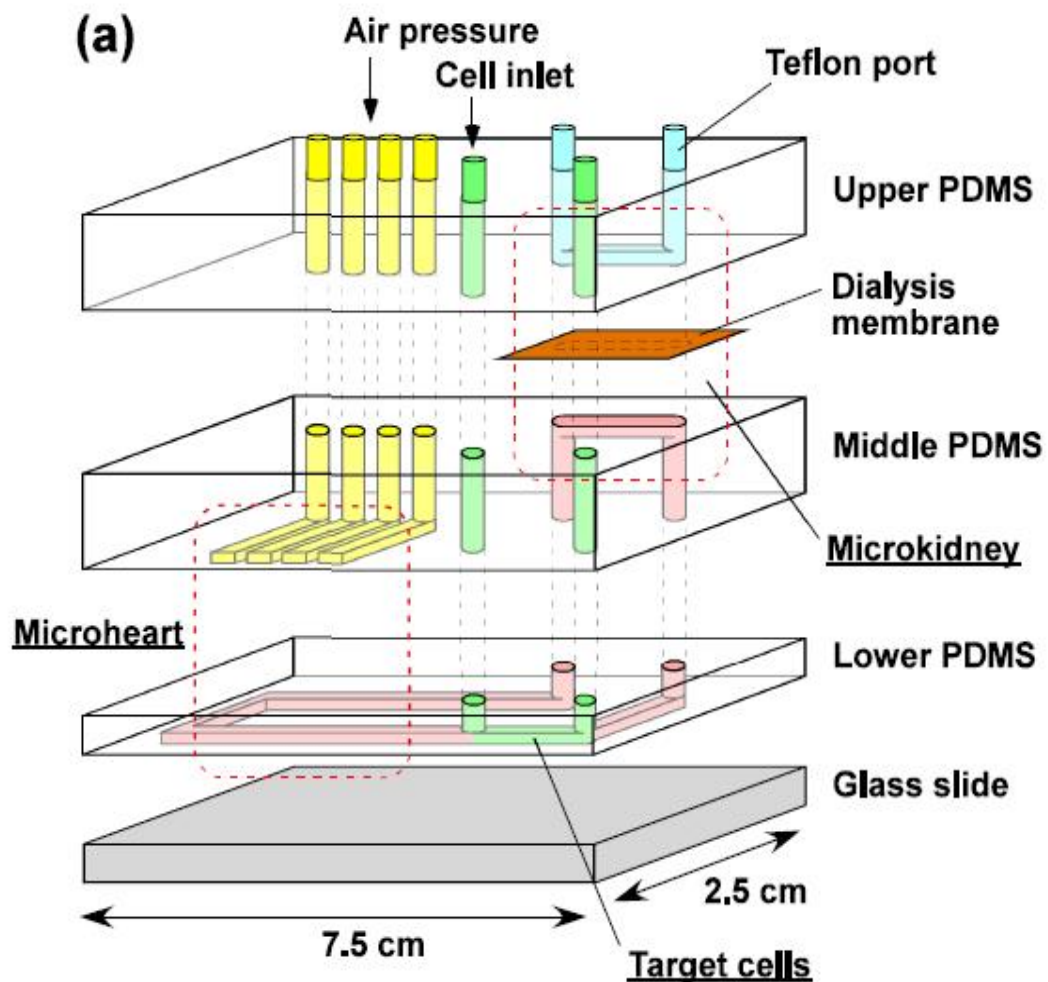


図 5-11 経時的な排出を考慮したバイオアッセイチップ
 (a) 作製概要 (b) 外観

標的細胞の増殖・減少率

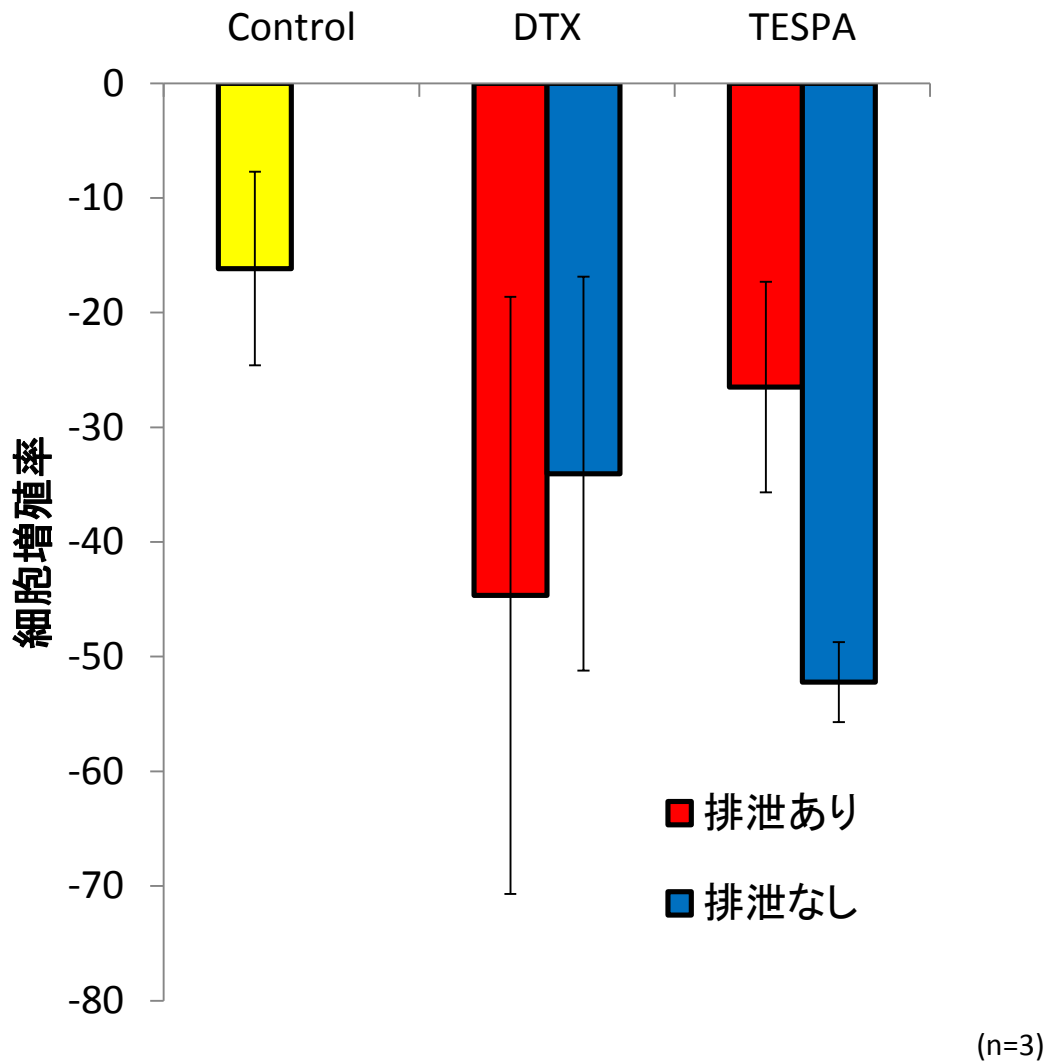


図 5-12 経時的な排出を考慮したバイオアッセイ結果

表5-1各模擬臓器のサイズ

腸上皮組織	肝組織	標的組織
Caco-2 細胞	HepG2細胞	MCF-7細胞
4 × 1.5 × 1 mm (L × W × H)	3.2 × 3 mm (i.d. × L)	4 × 1.5 × 0.2 mm (L × W × H)
培養支持膜上	Cytodex表面 垂直流路に充填	スライドガラス上 フィブロネクチン修飾

表 5-2 消化、吸収、代謝を考慮したバイオアッセイシステム送液構成

人工胃液 (0.057 μ l/min)	中和液 (0.057 μ l/min)	人工腸液 (0.057 μ l/min)
0.1 M HCl 0.05 M NaCl 0.2% ペプシン	0.1 M NaOH 20 mM Na ₂ HPO ₄	50 mM KH ₂ PO ₄ 24mM NaOH 80 mM NaCl 1 % パンクレアチン 0.3 % 胆汁抽出物
試料溶液 (0.2 μ l/min)	腸上皮培養液 (0.2 μ l/min)	下方流路送液 (0.4 μ l/min)
DMEM (-FBS) 試薬	DMEM 20% FBS 2 % NEAA	DMEM 10% FBS 1% NEAA

6章 総合考察

近年、動物実験は動物愛護の観点から削減の傾向にある。そこで動物実験に比べて倫理的に優れている点、研究にかかるコストを削減できる点などから培養細胞を用いたバイオアッセイに注目が集まっている。しかし、人体で起こる腸管での吸収や肝臓での代謝、排泄による減衰などが考慮に入られていないという欠点がある。また医療・創薬分野を中心に、消費する試薬や細胞の微量化や煩雑な操作の解消によるハイスループット化など、多くの課題が培養細胞を用いたバイオアッセイに課せられている。

そこで本研究ではより生体に近い人体のモデルを開発することを目指し、それらをマイクロチップ上に集積することで消費する試薬や細胞の微量化、煩雑な操作の解消を試みた。

3章ではマイクロチップ内で細胞を培養する技術と、マイクロチップの操作技術を確立した。細胞培養にはスタンダードなスライドガラス上に培養する方法の他、マイクロキャリアビーズや支持膜上での培養も検討し、マイクロチップ内細胞培養のバリエーションを広げ、様々な種類・性状の細胞の培養を実現した。またマイクロチップ内で駆動する小型ポンプの開発を行い、閉鎖した回路で液体のフローを発生させることに成功した。

4章では、3章で確立した細胞培養とマイクロポンプの技術を応用して、生体器官を模したアッセイ用マイクロシステムを開発した。マイクロ標的組織は最も標準的な様式でマイクロチップ内細胞培養を行い、バルクスケールの実験と比較して使用する細胞を 1/10 に削減することが可能となった。マイクロ消化管組織では人工胃液・人工腸液を用いて生理活性物質の崩壊試験を連続的に行うシステムを構築した。従来のピペッティングなどの操作は不要となり、ポンプによる駆動だけで連続した反応を実現できた。マイクロ腸上皮組織では、Caco-2 細胞のレイヤーを隔てた物質透過試験をマイクロチップ上で実現した。これにより使用する細胞の量を 1/10 に削減することが可能となった。マイクロ肝組織では HepG2 細胞を用いて代謝を行うシステムを構築した。高い代謝能を維持できるようマイクロキャリアビーズを用いてチップ内へ導入する細胞数を増やしたため、バルクスケールの方法と比較して用いる細胞を削減するに至らなかった。しかし、下流に標的組織を設置することで代謝産物を逐次輸送することができるため、バッチで行う実験よりもより生体に近い環境でアッセイを行うことが出来たと考えられる。例えば CPA の活性型代謝産物であるホスホラミドマスタードのような短い半減期を有する活性物質 (Graham *et al.*, 1983) も本システムでは分析することができた。マイクロ腎組織では透析膜を用いて、分子量およびタンパク質結合率を考慮した物質透過を

実現した。マイクロ腎組織はマイクロポンプと組み合わせることで、閉鎖流路からの排出を模した実験システムとして活用することができた。

5章では、4章で開発した各種マイクロ模擬器官を組み合わせ、一連の生体反応を一度の試行で行う複合的バイオアッセイチップの開発を行った。まずはバイオアベイラビリティにおいて重要な要素となる腸管吸収と肝代謝を考慮に入れた上で、バイオアクティビティを評価するシステムの開発を行った。本システムは抗癌剤やエストロゲン様活性物質、エストロゲンのアンタゴニストなど様々な生理活性物質の性状を評価することができた。また、このバイオアッセイチップに消化を行う過程を追加した。これらのバイオアッセイチップは従来法と比較して使用する試薬や細胞の量の低減を達成した。培地・消化液、薬剤の量は従来法の1/3に、Caco-2細胞とMCF-7細胞は1/10に低減できた。また、消化・吸収・代謝・生理活性を評価するそれぞれの組織を一つの流路でつなぎ合わせたため、これら一連のプロセスをポンプによる溶液操作のみで行うことができた。これによりアッセイのハイスループット化において大きな障害となる煩雑な操作の解消を実現した。標的組織へ常に新鮮な試薬が送られてくるため、不安定で半減期の短い代謝産物など、従来法では評価が困難だった物質のアッセイも可能となったと考えられる。

更に、透析膜とマイクロポンプを用いて、閉回路から経時的に排出が行われる環境下での活性を評価するバイオアッセイシステムを開発した。本システムは物質の残留性を考慮したバイオアッセイを行うことが可能である。本システムはタンパク質結合実験などで用いられる試薬量に対しておよそ1/100のスケールで実験を行うことを可能とした。本研究ではポンプの駆動力が生体のスケールと比較して十分でないことが原因で、半減期などを推定するには至らなかった。しかし今後の検討を行うことで、従来では難しかった *in vitro* 実験系での半減期の測定が可能になると期待される。

本システムは開発するにあたり、各模擬臓器部位間でスケールの検討を行うことができなかった。そのため本研究で得られた実験結果は定量的なものではなく、実際の生体に生理活性物質を投与する時に参考となる濃度などは得られない。これは模擬肝部位およびマイクロポンプのスケールに起因するところが多い。模擬肝部位で使用したHepG2細胞は培養や扱いが容易であるという利点があるが、肝臓で生産されている代謝酵素の一部しか発現していない。それゆえ肝臓のモデルとしては不十分である場合があると考えられる。より理想的な評価モデルを作製するには、初代培養細胞や肝スライスを利用するなどの改良が考えられる。しかしこれらは機能する時間が短いため、アッセイ時間の短縮などの改良も同時に行わなくてはならない。また、本研究で使用したマイクロポンプは、閉鎖流路を一巡させるのにおよそ100 minの時間を要した。生体の心臓は、およそ1 minで全血液量をポンプできる。このように生体と比較して送液効率が1/100程度と悪いため、ポンプの改良を行う必要があると考えられる。その方

法の一つとして、空気をチップ内へ送る導入ポートを溶液流路の上部に配置するという方法が考えられる(作田ら, 2012)。この工夫により制御流路を使う場合よりも大きな面積を押しつぶすことが可能となり、ポンプ効率が上昇する。これらの改良を行い、各部位のスケールを再度検討することにより、定量的な評価も可能な分析システムが構築できるのではないかと期待される。

また、Organ-on-a-chip の研究分野は近年盛んに研究されており、そこで報告されている技術の本システムに応用することで、更に高度な分析が実現する可能性がある。例えば Kim らによって報告された、マイクロチップ内で腸上皮細胞と腸内細菌を共培養する技術(Kim *et al.*, 2012)は、腸内細菌叢の効果をも考慮した複合的なバイオアッセイに応用が期待される。

このように本システムを改良して、より高度な分析システムを開発することは可能だと考えられる。しかし生体作用には複雑で *in vitro* 実験系では評価できないものも存在する。その一つが尿細管での再吸収である。原尿として体外へ排出された生理活性物質は、尿細管で体内へ再吸収される。この過程を評価するため、イヌ腎臓尿細管上皮由来細胞株である MDCK 細胞を利用した実験システムなどが模索されているが、トランスポーターが十分に機能しておらず、尿細管のモデルとして利用されるには到っていない。また、体内の脂溶性分子を胆汁成分として腸腔側へ排出する肝排泄の過程も *in vitro* 実験系で評価が難しいとされる。これらのような *in vitro* 実験系で評価ができない事柄に関しては、本システムに搭載することができない。

また、生理活性物質が効果を発揮する部位についての情報が前もって必要だということも問題点として挙げられる。そのため未知物質への応用などは難しく、副作用などについても使用者が想定した事柄についてしか情報を得ることができない。これらの理由により、本分析システムは動物実験に完全に置き換わるものとはなりえない。しかし、初期スクリーニングなどに本システムを利用することで動物実験の削減を行うことができると考えられ、その点で意義があると考えられる。

食品中の栄養成分や機能性成分の解析、環境中の化学物質のリスク評価、薬剤スクリーニング等、経口摂取した物質が生体へ及ぼす影響を扱う分野は非常に多岐にわたる。いずれの分野においても微量化、迅速化、ハイスループット化などが求められており、本システムはこれらの実現に貢献できると期待される。

また患者の個性に沿ったテーラーメイド医療が注目を集めており、本システムはこの領域にも貢献できると考えている。すなわち、標的組織に患者の患部切片を用いることで、個体の個性を反映した試験が可能となる。標的だけでなく肝組織についても、患者の肝片を用いることで副作用や毒性試験に関しても個性を反映した結果が得られると期待される。

今後マルチアレイ化などについて検討を行い、ハイスループット化を目指すことで、

上に挙げたような生命科学分野に大きく貢献できるものと考えられる。

参考文献

- Alabaster O, Magrath IT, Habbersett MC, Herman CJ: Effects of Cyclophosphamide on the mithramycin-DNA fluorescence of human lymphoma-cells - possible result of guanine alkylation, *JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY & CYTOCHEMISTRY*, **27(1)**, 500-504(1979)
- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbott BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR: Feasibility of Drug Screening with Panels of Human-Tumor Cell-Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay, *CANCER RESEARCH*, **48(3)**, 589-601 (1988)
- Allred CD, Allred KF, Ju Y.H, Virant SM, Helferich WG: Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner, *CANCER RESEARCH*, **61(13)**, 5045-5050(2001)
- Alsenz J, Haenel E: Development of a 7-day, 96-well Caco-2 permeability assay with high-throughput direct UV compound analysis, *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, **20 (12)**, 1961-1969(2003)
- Baker M: A Living System on a Chip, *NATURE*, **471(7340)**, 661-665(2011)
- Busse D, Busch FW, Bohnenstengel F, Eichelbaum M, Fischer P, Opalinska J, Schumacher K, Schweizer E, Kroemer HK: Dose escalation of cyclophosphamide in patients with breast cancer: Consequences for pharmacokinetics and metabolism, *JOURNAL OF CLINICAL ONCOLOGY*, **15(5)**, 1885-1896(1997)
- Calsamiglia S, Stern MD: A 3-Step In-Vitro Procedure for Estimating Intestinal Digestion of Protein in Ruminants, *JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE*, **73(5)**, 1459-1465(1995)
- Camaggi CM, Strocchi E, Comparsi R, Testoni F, Angelelli B, Pannuti F: Biliary excretion and pharmacokinetics of 4'epidoxorubicin (epirubicin) in advanced cancer patients, *CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY*, **18(1)**, 47-50(1986)
- Chang TK, Weber GF, Crespi CL, Waxman DJ: Differential Activation of Cyclophosphamide and Ifosfamide by Cytochromes P-450 2B and 3A in Human Liver Microsomes, *CANCER RESEARCH*, **53**, 5629-5637(1993)

- Chen G, Waxman DJ: Role of cellular glutathione and glutathione-s-transferase in the expression of alkylating agent cytotoxicity in human breast-cancer cells, *BIOCHEMICAL PHARMACOLOGY*, **47(6)**, 1079-1087(1994)
- Chow LWC, Loo WTY: The differential effects of cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil on apoptotic marker (CPP-32), pro-apoptotic protein (p21(WAF-1)) and anti-apoptotic protein (bcl-2) in breast cancer cells, *BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT*, **80(3)**, 239-244(2003)
- Ciocca DR, Fuqua SAW, Locklim S, Toft DO, Welch WJ, McGuire WL: Response of Human Breast-Cancer Cells to Heat-Shock and Chemotherapeutic Drugs, *CANCER RESEARCH*, **52(13)**, 3648-3654 (1992)
- Davidsson R, Boketoft A, Bristulf J, Kotarsky K, Olde B, Owman C, Bengtsson M, Laurell T, Emneus J: Developments toward a microfluidic system for long-term monitoring of dynamic cellular events in immobilized human cells, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **76(16)**: 4715-4720 (2004)
- De Clerck LS, Bridts CH, Mertens AM, Moens MM, Stevens WJ: Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function, *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, **172(1)**, 115-124(1994)
- Dittrich PS, Manz A: Lab-on-a-chip: microfluidics in drug discovery, *NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY*, **5(3)**, 210-218(2006)
- Drahushuk AT, McGarrigle BP, Tai HL, Kitareewan S, Goldstein JA, Olson JR: Validation of precision-cut liver slices in dynamic organ culture as an in vitro model for studying CYP1A1 and CYP1A2 induction, *TOXICOLOGY AND APPLIED PHARMACOLOGY*, **140(2)**, 393-403 (1996)
- Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM: Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane), *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **70**, 4974-4984(1998)
- Elliott NT, Yuan F: A Review of Three-Dimensional In Vitro Tissue Models for Drug Discovery and Transport Studies, *JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, **100(1)**, 59-74(2011)
- Folch A, Jo BH, Hurtado O, Beebe DJ, Toner M: Microfabricated elastomeric

- stencils for micropatterning cell cultures, *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 346-353(2000)
- Fujii S, Uematsu M, Yabuki S, Abo M, Yoshimura E, Sato K: Microbioassay system for an anti-cancer agent test using animal cells on a microfluidic gradient mixer, *ANALYTICAL SCIENCES*, **22(1)**, 87-90(2006)
- Ganzina F: 4'-epi-doxorubicin, a new analogue of doxorubicin: a preliminary overview of preclinical and clinical data, *CANCER TREATMENT REVIEWS*, **10(1)**, 1-22(1983)
- Gao D, Liu HX, Jiang YY, Lin JM: Recent developments in microfluidic devices for in vitro cell culture for cell-biology research, *TRAC-TRENDS IN ANALYTICAL CHEMISTRY*, **35**, 150-164(2012)
- Goda T, Matsuno R, Konno T, Takai M, Ishihara K: Photografting of 2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine from polydimethylsiloxane: Tunable protein repellency and lubrication property, *COLLOIDS AND SURFACES B-BIOINTERFACES*, **63(1)**, 64-72(2008)
- Goto M, Sato K, Murakami A, Tokeshi M, Kitamori T: Development of a microchip-based bioassay system using cultured cells, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **77(7)**, 2125-2131(2005)
- Graham MI, Shaw IC, Souhami RL, Sidau B Harper PG, Mclean AEM: Decreased Plasma Half-Life of Cyclophosphamide During Repeated High-Dose Administration, *CANCER CHEMOTHERAPY AND PHARMACOLOGY*, **10(3)**, 192-193(1983)
- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P: Human Estrogen-Receptor cDNA - Sequence, Expression And Homology to V-ERB-A, *NATURE*, **320(6058)**, 134-139(1986)
- Hilgers AR, Conradi RA, Burton PS, Caco-2 Cell Monolayers as a Model for Drug Transport across the Intestinal-Mucosa, *PHARMACEUTICAL RESEARCH*, **7(9)**, 902-910(1990)
- Hua P, Tsai WJ, Kuo SM: Estrogen response element-independent regulation of gene expression by genistein in intestinal cells, *BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA-GENE STRUCTURE AND EXPRESSION*, **1627(2-3)**, 63-70(2003)
- Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Hsin HY, Ingber DE: Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip, *SCIENCE*, **328(5986)**, 1662-1668(2010)

- Imura Y, Asano Y, Sato K, Yoshimura E: A microfluidic system to evaluate intestinal absorption, *ANALYTICAL SCIENCES*, **25(12)**, 1403-1407(2009)
- Imura Y, Sato K, Yoshimura E: Micro total bioassay system for ingested substances: assessment of intestinal absorption, hepatic metabolism, and bioactivity. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **82**, 9983-9988 (2010)
- Imura Y, Yoshimura E, Sato K: Micro Total Bioassay System for Oral Drugs: Evaluation of Gastrointestinal Degradation, Intestinal Absorption, Hepatic Metabolism, and Bioactivity. *ANALYTICAL SCIENCES*. **28**, 197-199 (2012)
- Imura Y, Yoshimura E, Sato K: Microcirculation system with a dialysis part for bioassays evaluating anticancer activity and retention. *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **85**, 1683-1688 (2013)
- Imura Y, Yoshimura E, Sato K: Development of a Micro Total Bioassay System Mimicking the Human Body for Oral Medicines. *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems 2008*, 588-590(2008).
- Imura Y, Yoshimura E, Sato K: Development of a Micro Total Oral Drug Assay System, From the Stomach to the Target Tissue. *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems 2009*. 1261-1263 (2009).
- Johnson LR: Functional-Development Of The Stomach, *ANNUAL REVIEW OF PHYSIOLOGY*, **47**, 199-215(1985)
- Jordan VC, Koerner S: Tamoxifen (ICI 46,474) and human carcinoma 8s estrogen-receptor, *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*, **11(3)**, 205-206(1975)
- Kajanti MJ, Pyrhonen SO, Maiche AG: Oral tegafur in the treatment of metastatic breast-cancer - a phase-II study, *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*, **29A(6)**, 863-866(1993)
- Kaji H, Yokoi T, Kawashima T, Nishizawa M, Directing the flow of medium in controlled cocultures of HeLa cells and human umbilical vein endothelial cells with a microfluidic device, *LAB ON A CHIP*, **10(18)**, 2374-2379(2010)
- Kim HJ, Huh D, Hamilton G, Ingber DE: Human gut-on-a-chip inhabited by microbial flora that experiences intestinal peristalsis-like motions and flow, *LAB ON A CHIP*, **12(12)**, 2165-2174(2012)
- Kimura H, Yamamoto T, Sakai H, Sakai Y, Fujii T: An integrated microfluidic system for long-term perfusion culture and on-line monitoring of

- intestinal tissue models, *LAB ON A CHIP*, **8(5)**, 741-746(2008)
- Kimura H, Yamamoto T, Sakai Y, Fujii, T: A chip-based in vitro model for cytotoxicity test using Caco-2 and Hep G2, *Proceedings of MicroTAS 2008 conference*, 21-23(2008)
- Konishi Y: Modulations of food-derived substances on intestinal permeability in Caco-2 cell monolayers, *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY*, **67(10)**, 2297-2299(2003)
- Langer R, Tirrell DA: Designing materials for biology and medicine, *NATURE*, **428(6982)**, 487-492(2004)
- Leclerc E, Sakai Y, Fujii T: Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane), *BIOMEDICAL MICRO-DEVICES*, **5(2)**, 109-114(2003)
- Lee AJ, Cai MXX, Thomas PE, Conney AH, Zhu BT, Characterization of the oxidative metabolites of 17 beta-estradiol and estrone formed by 15 selectively expressed human cytochrome P450 isoforms, *ENDOCRINOLOGY*, **144(8)**, 3382-3398(2003)
- Li AP, Reith MK, Rasmussen A, Gorski JC, Hall SD, Xu L, Kaminski DL, Cheng LK: Primary human hepatocytes as a tool for the evaluation of structure-activity relationship in cytochrome P450 induction potential of xenobiotics: evaluation of rifampin, rifapentine and rifabutin, *CHEMICO-BIOLOGICAL INTERACTIONS*, **107(1-2)**, 17-30(1997)
- Lorenz H, Despont M, Fahrni N, Brugger J, Vettiger P, Renaud P: High-aspect-ratio, ultrathick, negative-tone near-UV photoresist and its applications for MEMS, *SENSORS AND ACTUATORS A-PHYSICAL*, **64 (1)**, 33-39 (1998)
- Ma R, Xie L, Han C, Su K, Qiu TA, Wang L, Huang GL, Xing WL, Qao J, Wang JD, Cheng J: In Vitro Fertilization on a Single-Oocyte Positioning System Integrated with Motile Sperm Selection and Early Embryo Development, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **83(8)**, 2964-2970(2011)
- van Maanen MJ, Smeets CJM, Beijnen JH: Chemistry, pharmacology and pharmacokinetics of N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (Thio TEPA), *CANCER TREATMENT REVIEWS*, **26(4)**, 257-268(2000)
- Macagno ER, Uller KJ, Kristan WB, Deriemer SA, Stewart R, Granzow B: Mapping Of Neuronal Contacts With Intracellular Injection Of Horseradish-Peroxidase And Lucifer Yellow In Combination, *BRAIN*

- RESEARCH*, **217(1)**, 143-149(1981)
- Makioka A, Kumagai M, Kobayashi S, Takeuchi T: Effect of artificial gastrointestinal fluids on the excystation and metacystic development of *Entamoeba invadens*, *PARASITOLOGY RESEARCH*, **98**, 443-446(2006)
- Manz A, Effenhauser CS, Burggraf N, Harrison DJ, Seiler K, Fluri K: Electroosmotic Pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical-analysis systems, *Micromechanics and Microengineering*, **4**, 257-265(1994)
- Marino AM, Yarde M, Patel H, Chong SH, Balimane PV: Validation of the 96 well Caco-2 cell culture model for high throughput permeability assessment of discovery compounds, *INTERNATIONAL JOURNAL OF PHARMACEUTICS*, **297**, 235-241(2005)
- Mcdermott BJ, Double JA, Bibby MC, Wilman DEV, Loadman PM, Turner RL: Gas-Chromatographic Analysis of Triethylenethiophosphoramidate And Triethylenephosphoramidate in Biological Specimens, *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY*, **338(2)**, 335-345(1985)
- McDonald JC, Whitesides GM: Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices, *ACCOUNTS OF CHEMICAL RESEARCH*, **35(7)**, 491-499(2002)
- Morito K, Hirose T, Kinjo J, Hirakawa T, Okawa M, Nohara T, Ogawa S, Inoue S, Muramatsu M, Masamune Y: Interaction of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta, *BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, **24(4)**, 351-356(2001)
- Morse DL, Gray H, Payne CM, Gillies RJ: Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells, *MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS*, **4(10)**, 1495-1504(2005)
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F: Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity, *EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY* **267 (17)**, 5421-5426(2000)
- Odake T, Tabuchi M, Sato T, Susaki H, Korenaga T: Fluorescent derivatization of nitrite ions with 2,3-diaminonaphthalene utilizing a pH gradient in a Y-shaped microchannel, *ANALYTICAL SCIENCES*, **17(4)**, 535-538(2001)
- Oravcova J, Bohs B, Lindner W: Drug-protein binding studies - New trends

- in analytical and experimental methodology, *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B-BIOMEDICAL APPLICATIONS*, **677(1)**, 1-28 (1996)
- Petit T, Wilt M, Velten M, Millon R, Rodier JF, Borel C, Mors R, Haegelé P, Eber M, Ghnassia JP: Comparative value of tumour grade, hormonal receptors, Ki-67, HER-2 and topoisomerase II alpha status as predictive markers in breast cancer patients treated with neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy, *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*, **40(2)**, 205-211(2004)
- Pinkerton TC, Koeplinger KA: Determination of Warfarin-Human Serum-Albumin Protein-Binding Parameters by an Improved Hummel-Dreyer High-Performance Liquid-Chromatographic Method Using Internal Surface Reversed-Phase Columns, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **62(19)**, 2114-2122(1990)
- Rueff J, Chiapella C, Chipman JK, Darroudi F, Silva ID, Duverger-van-Bogaert M, Fonti E, Glatt HR, Isern P, Laires A, Leonard A, Llagostera M, Mossesso P, Natarajan AT, Palitti F, Rodrigues AS, Schinoppi A, Turchi G, WerleSchneider G: Development and validation of alternative metabolic systems for mutagenicity testing in short-term assays, *MUTATION RESEARCH*, **353**,151-176(1996)
- Ruoslahti E, Hayman EG, Pierschbacher M, Engvall E: Fibronectin-purification, immunochemical properties, and biological-activities, *METHODS IN ENZYMOLOGY*, **82**, 803-831 (1982)
- Sakai Y, Shoji R, Kim BS, Sakoda A, Suzuki M: Cultured human-cell-based bioassay for environmental risk management, *ENVIRONMENTAL MONITORING AND ASSESSMENT*, **70(1-2)**, 57-70(2001)
- Sato K, Imura Y, Yoshimura E: Development of a Micro cardiovascular system for evaluation of anticancer activity and renal clearance. *Proceedings of the Micro Total Analysis Systems 2010*, 1526-1528 (2010)
- Shimizu K, Fujita H, Nagamori E: Alignment of Skeletal Muscle Myoblasts and Myotubes Using Linear Micropatterned Surfaces Ground With Abrasives, *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING* **103(3)**, 631-638(2009)
- Slavotinek A, Mcmillan TJ, Steel CM: Measurement of radiation survival

- using the MTT assay, *EUROPEAN JOURNAL OF CANCER*, **30A (9)**, 1376-1382(1994)
- Solomon KR, Baker DB, Richards RP, Dixon DR, Klaine SJ, LaPoint TW, Kendall RJ, Weisskopf CP, Giddings JM, Giesy JP, Hall LW, Williams WM: Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters, *ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY AND CHEMISTRY*, **15(1)**, 31-74(1996)
- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO: The e-screen assay as a tool to identify estrogens - an update on estrogenic environmental-pollutants, *ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES*, **103**, 113-122
- Spence DM, Torrence NJ, Kovarik ML, Martin RS: Amperometric determination of nitric oxide derived from pulmonary artery endothelial cells immobilized in a microchip, *ANALYST*, **129 (11)**, 995-1000(2004)
- Sung JH, Kam C, Shuler ML: A microfluidic device for a pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) model on a chip, *LAB ON A CHIP*, **10(4)**, 446-455 (2010)
- Stearns V, Johnson MD, Rae JM, Morocho A, Novielli A, Bhargava P, Hayes DF, Desta Z, Flockhart DA: Active tamoxifen metabolite plasma concentration after coadministration of tamoxifen and the selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine, *JOURNAL OF THE NATIONAL CANCER INSTITUTE*, **95(23)**, 1758-1764(2003)
- Takayama S, McDonald JC, Ostuni E, Liang MN, Kenis PJA, Ismagilov RF, Whitesides GM: Patterning cells and their environments using multiple laminar fluid flows in capillary networks, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, **96(10)**, 5545-5548(1999)
- Takayama S, Ostuni E, LeDuc P, Naruse K, Ingber DE, Whitesides GM: Selective chemical treatment of cellular microdomains using multiple laminar streams, *Chemistry & Biology*, **10**, 123-130(2003)
- Tanaka Y, Sato K, Yamato M, Okano T, Kitamori T: Cell culture and life support system for microbio-reactor and bioassay, *JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY A*, **1111(2)**, 233-237(2006)
- Tanaka Y, Yamato M, Okano T, Kitamori T, Sato K: Evaluation of effects of shear stress on hepatocytes by a microchip-based system,

- MEASUREMENT SCIENCE & TECHNOLOGY*, **17(12)**, 3167-3170 (2006)
- Tanaka Y, Sato K, Shimizu T, Yamato M, Okano T, Kitamori T: Biological cells on microchips: New technologies and applications, *BIOSENSORS & BIOELECTRONICS*, **23(4)**, 449-458(2007)
- Terry SC, Jerman JH, Angell JB: A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer, *IEEE TRANSACTIONS ON ELECTRON DEVICES*, **26(12)**, 1880-1886(1979)
- Tokeshi M, Minagawa T, Uchiyama K, Hibara A, Sato K, Hisamoto H, Kitamori T: Continuous-flow chemical processing on a microchip by combining microunit operations and a multiphase flow network, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **74(7)**, 1565-1571(2002)
- Tokuyama T, Fujii S, Sato K, Abo M, Okubo A: Microbioassay system for antiallergic drug screening using suspension cells retaining in a poly(dimethylsiloxane) microfluidic device, *ANALYTICAL CHEMISTRY*, **77(10)**, 3309-3314(2005)
- Unger MA, Chou HP, Thorsen T, Scherer A, Quake SR: Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography, *SCIENCE*, **288(7)**, 113-116(2000)
- Urien S, Barre J, Morin C, Paccaly A, Montay G, Tillement JP: Docetaxel serum protein binding with high affinity to alpha(1)-acid glycoprotein, *INVESTIGATIONAL NEW DRUGS*, **14(2)**, 147-151(1996)
- Vellonen KS, Honkakoski P, Urtti A: Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity, *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, **23 (2)**, 181-188(2004)
- Visvikis A, Goergen JL, Oster T, Bagrel D, Wellman M, Marc A, Engasser JM, Siest G: Gamma-Glutamyl-Transferase from Human Hepatoma-Cell Lines - Purification and Cell-Culture of HepG2 on Microcarriers, *CLINICA CHIMICA ACTA*, **191(3)**, 221-232(1990)
- Weenen H, Lankelma J, Penders PG, McVie JG, ten Bokkel Huinink WW, de Planque MM, Pinedo HM, Pharmacokinetics of 4'-epi-doxorubicin in man, *INVEST NEW DRUGS*, **1**, 59-64(1983)
- Weston SA, Parish CR: New Fluorescent Dyes for Lymphocyte Migration Studies - Analysis by Flow-Cytometry and Fluorescence Microscopy, *JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS*, **133(1)**, 87-97(1990)

- Worboys PD, Bradbury A, Houston JB: Kinetics of Drug-Metabolism in Rat-Liver Slices - Rates of Oxidation of Ethoxycoumarin and Tolbutamide, Examples of High-Clearance and Low-Clearance Compounds, *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, 23(3), 393-397(1995)
- Yamada M, Sasaki C, Isomura T, Seki M: Microfluidic reactor array for high-throughput screening of protein crystallization conditions, *MICRO TOTAL ANALYSIS SYSTEMS 2003*, 7(1), 449-452(2003)
- Yamamoto D, Tanaka K, Nakai K, Baden T, Inoue K, Yamamoto C, Takemoto H, Kamato K, Hirata H, Morikawa S, Inubushi T, Hioki K: Synergistic effects induced by cycloprodigosin hydrochloride and epirubicin on human breast cancer cells, *BREAST CANCER RESEARCH AND TREATMENT*, 72(1), 1-10(2002)
- Yoshitomi S, Ikemoto K, Takahashi J, Miki H, Namba M, Asahi S: Establishment of the transformants expressing human cytochrome P450 subtypes in HepG2, and their applications on drug metabolism and toxicology, *TOXICOLOGY IN VITRO*, 15, 245-256(2001)
- Zaya MJ, Hines RN, Stevens JC. Epirubicin glucuronidation and UGT2B7 developmental expression, *DRUG METABOLISM AND DISPOSITION*, 34(12), 2097-2101(2006)
- Zeck G, Fromherz P: Noninvasive neuroelectronic interfacing with synaptically connected snail neurons immobilized on a semiconductor chip, *PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA*, 98(18), 10457-10462(2001)
- Zhang C, Zhao ZQ, Rahim NAA, van Noort D, Yu H: Towards a human-on-chip: Culturing multiple cell types on a chip with compartmentalized microenvironments, *LAB ON A CHIP*, 9(22), 3185-3192(2009)
- Zhang Y, Lee HK, Li SFY: Fluorescence detection in short capillary and chip using a variable wavelength epi-fluorescence microscope, *TALANTA*, 45, 613-618(1998)
- 池川信夫: 生理活性物質のバイオアッセイ, 講談社(1984)
- 北森武彦, 庄司習一, 馬場嘉信, 藤田博之: マイクロ化学チップの技術と応用, 丸善(2004)
- 坂井建雄 河原克雅: 人体の正常構造と機能, 日本医事新報社(2008)

カツツング BG: カツツング薬理学 原著 9 版, 丸善(2005)

渡辺友子: MDR1 遺伝子ノックダウン Caco-2 細胞の BD BioCoat Cell Culture
Insert を使った機能評価, BD Bioscience(2006)

謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご多忙の中、大変多くのそして的確なご指導・ご助言を賜りました分析化学研究室・吉村悦郎教授、安補充先生(明治大学)、佐藤記一先生(群馬大学)に心より感謝申し上げます。

マイクロチップ関連の技術を親身になりご指導、ご助言を賜りました浅野恭行さん(凸版印刷)、原田基さん(KIRIN)、坂本康幸さんに厚く御礼申し上げます。生化学・分析化学実験に協力してくれた小川進也さん(協和発酵キリン)に感謝いたします。研究を進める上で様々な面でお世話になった、分析化学研究室の先輩・同輩・後輩の皆様にも心より感謝申し上げます。研究の助言をいただいた群馬大学角田欣一先生と群馬大学分析化学研究室の皆様、日本女子大学佐藤香枝先生と日本女子大学分析化学研究室の皆様にも厚く御礼申し上げます。

最後に温かく見守って下さった家族に、そして友人に感謝申し上げます。