

論文の内容の要旨

論文題目

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

氏名 井村 祐己

序論

経口摂取する薬剤,食品中の機能成分,環境中の生理活性物質などは、生体作用による種々のプロセスを経た後にその効果を発揮する。具体的には胃,腸などの消化管による消化作用、腸上皮における吸収、肝臓における代謝等を経て初めて体内で効果を示す。生体内に入り込んだこれらの物質は、生体内を循環する間に腎臓や肝臓から排泄されて濃度を経時的に減衰させていく。培養細胞を用いたバイオアッセイは生理活性物質の活性評価に用いられるが、このような体内動態を考慮したアッセイをすることはできない。体内動態を模した *in vitro* 評価システムは存在しているが、性状の一面しか評価することができない。すなわち、消化は消化を評価する分析システムで、代謝は代謝を評価する分析システムで独立に行われ、物質の複合的な物性を評価する *in vitro* 分析システムは存在しない。体内動態と生理活性を同時に分析するためにはマウスなどの動物を使用した評価が行われる。しかし動物実験はコストが高く、また近年では動物愛護の観点から削減の傾向が続いている。

また近年、マイクロ分析システムが新時代の分析手法として注目を集めている。数センチ程度のチップ上に分析システムを構築し、反応・検出をオンチップで行うことを目的としたものである。システムを小型化することで試料の微量化,低コスト化が可能となり、貴重なサンプルを浪費することなく分析が行えるところに利点がある。バイオの分野では反応部位をアレイ状に設置し、一度の操作で同時に何千もの反応を行う DNA マイクロアレイチップや抗体チップなどが使用されている。一方化学の分野ではチップ内に溶液のフロー

を生じさせ、直列に配置した複数の反応部位を結ぶことで分離・反応・検出という一連の操作を一つのチップ上で行うフルイディックチップが使用されている。マイクロ分析システムの利点はハイスループットな分析が可能となるところにあり、種々の生理活性物質データベースが増加の一途を辿る近年、その応用が期待されている。

そこで本研究では、生理活性物質の体内動態と生理活性を複合的に分析できるシステムの構築を目的とした。まず、生体臓器を模したマイクロ分析システムの開発を行い、それらを直列に設置することで複合的なバイオアッセイを行うシステムの作製を試みた。

方法：マイクロチップの作製

マイクロチップ素材には熱硬化性シリコーン樹脂であるポリジメチルシロキサン (PDMS) を使用した。流路の作製には凸型の鋳型を使用し、PDMSへ型取りすることでPDMSシートに流路型の造型を施した。鋳型の作製には高膜厚型フォトリソ SU-8 を使用した。PDMSシートは酸素プラズマ処理を行い、シート同士および基板となるスライドガラスとを接着した。マイクロチップへの送液はマイクロシリンジポンプにより行った。

消化・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップの開発

バイオアベイラビリティ、すなわち経口摂取した生理活性物質の生体内への取り込みとバイオアクティビティを複合的に評価できる分析システムの開発を行った。このマイクロチップには4つの部位を構築した。人工胃液、人工腸液により消化を行う模擬消化管組織、ヒト結腸癌由来細胞株 Caco-2 の細胞レイヤーを隔てた物質透過を行う模擬腸上皮組織、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 による代謝を行う模擬肝組織、バイオアッセイのターゲットとなるヒト乳癌由来細胞株 MCF-7 を培養した標的部位である (Fig.1)。(a)からマイクロチップへ導入した試薬は(b)より送液した人工胃液と混合し、模擬胃において消化させた。続いて中和液(c)で pH を中性に戻し、人工腸液(d)と混合して模擬十二指腸において消化させた。その後、模擬腸上皮組織にて Caco-2 細胞レイヤーによる選択的な透過を行い、下方流路へ移行した試薬は模擬肝組織への輸送ののち、HepG-2 細胞による代謝を行った。これらのプロセスを経た後に標的部位で生理活性を評価した。

模擬腸上皮組織の Caco-2 細胞は、PDMS シート間に挟み込んだコラーゲン修飾半透膜上でコンフルエントに培養することができ (Fig.1 左下)、物質の選択的な透過を行うことが可能となった。模擬肝組織の HepG2 細胞は、マイクロキャリアーズ Cytodex 上に培養して (Fig.1 中央下) チップ内へ充填することにより、高い代謝能を示すことができた。標的部位の MCF-7 細胞は、スライドガラス表面を細胞外マトリックスであるフィブロネクチンで修飾することによりチップ内で培養することができた (Fig.1 右下)。バイオアッセイのモデル試薬として、プロドラッグ型抗癌剤のシクロホスファミド (CPA)、静脈注射で使用される抗癌剤エピルビシン (EPI)、腸溶性錠剤で使用されるプロドラッグ型抗癌剤のテガフル (TGF) などを使用した。バイオアッセイの結果、それぞれの模擬臓器を機能させない対象実

験より、CPA や TGF は腸上皮をよく透過し、肝臓で代謝されることで始めて高い活性を示した。一方の EPI は元々高い抗癌活性を有しており肝臓代謝で活性は変化しないものの、腸上皮を透過することはできなかった。また、消化過程の有無は CPA の活性には影響を与えなかったのに対し、TGF の代謝は消化を減らすことで著しく低下した。すなわち、CPA と TGF が代謝を受けて活性化される性質、EPI が経口摂取に向かない性質、TGF が消化作用で活性を失う性質などが示唆され、これらは既知の性質と合致している。このことから本システムの有用性が示唆された。

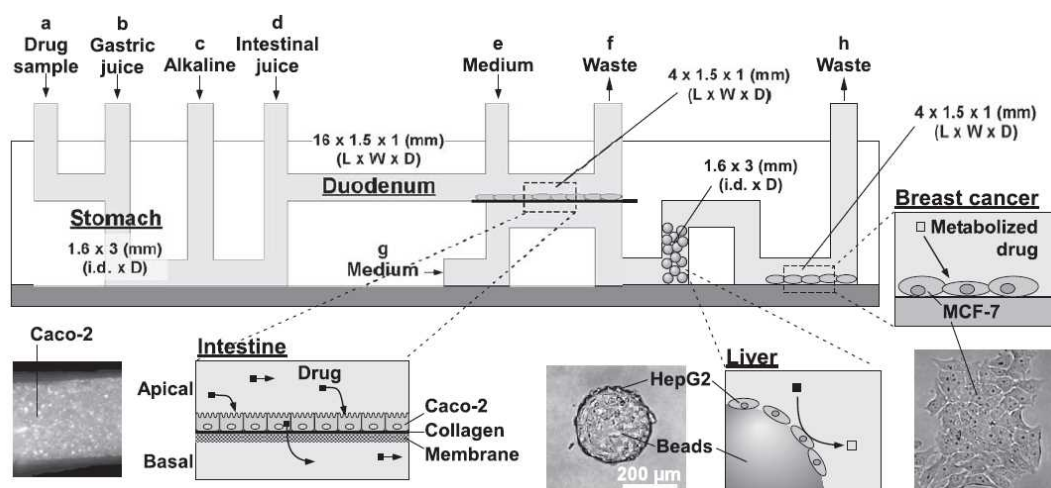


Fig.1 消化・吸収・代謝を考慮に入れたバイオアッセイチップ模式図

循環・排出を考慮に入れたバイオアッセイチップの開発

経時的な減衰、すなわち体内からの生理活性物質の除去とバイオアクティビティを複合的に評価できる分析システムの開発を行った。このマイクロチップには3つの部位を構築した。透析膜を隔てた物質透過を行う模擬腎組織、流路を蠕動させて閉鎖流路を循環させるマイクロポンプ、MCF-7細胞を培養した標的部位である(Fig.2)。閉鎖流路に添加した試薬は、模擬腎(a)にて外部流路へ排出させた。その際、閉鎖流路内のタンパク質と結合性の高い試薬は閉鎖流路に留まる割合が高く、フリーの形態で存在しやすい試薬は排出されやすい。閉鎖流路は蠕動ポンプ型のマイクロポンプ(b)により循環を行った。このように経時的に排出される試薬の生理活性を標的部位(c)にて評価した。

モデル試薬として、血漿タンパク質結合率の高い抗癌剤であるドセタキセル(DTX)と、低い結合率のチオテパ(TESPA)を用いた。バイオアッセイの結果 DTX は高い抗癌活性を示したが、TESPA の抗癌活性は初期濃度と比較して減少した。DTX は閉鎖流路内のタンパク質に吸着して、模擬腎組織の透析膜をあまり通過しなかったために減衰が少なかったものと考えられる。一方 TESPA はフリーの状態で存在したため、透析膜を通過して速やかに閉鎖流路外部へ排出されたものと考えられる。これらは既知の性状と合致しており、本システムの有用性が示唆された。

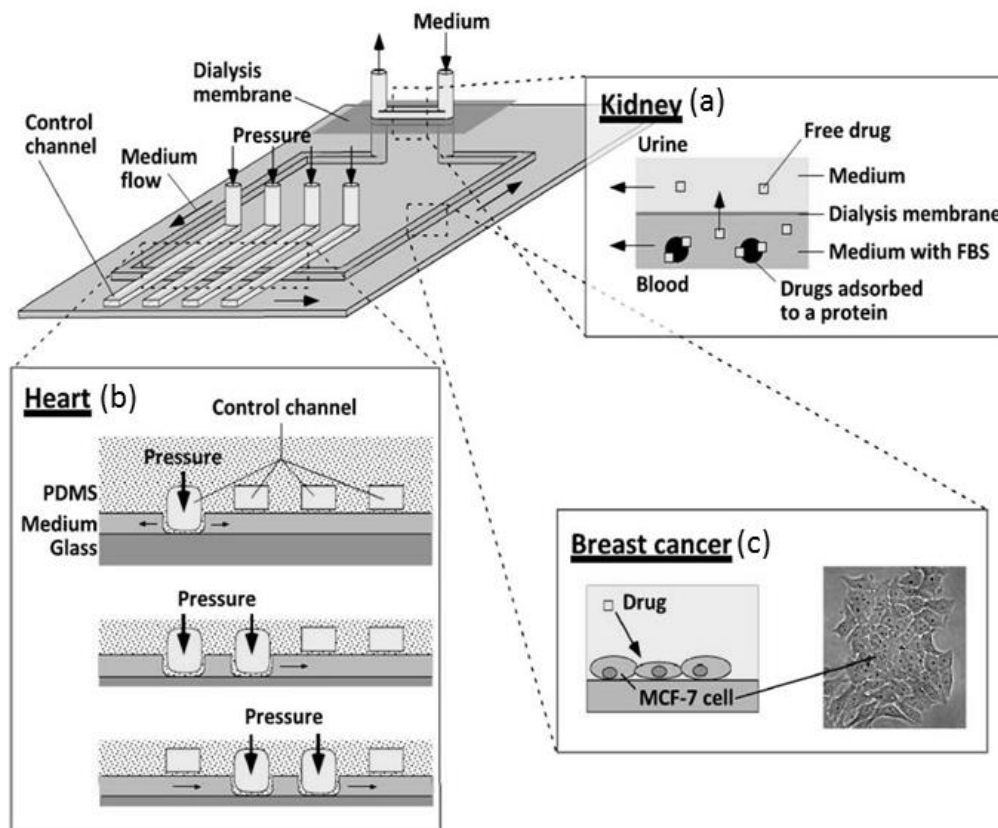


Fig. 2 循環・排出を考慮に入れたバイオアッセイチップ模式図

総括

本研究で開発した分析システムは、バイオアベイラビリティや経時的な排出など複合的な生体作用を考慮した上でバイオアッセイを行うことを可能とした。またバッチ実験と比較して使用する試薬や細胞を低減しており、アッセイ時間の短縮も可能であった。一連のプロセスをポンプによる駆動だけで行い、手作業による操作を省くことができるためハイスループット分析に貢献することができると期待される。

原著論文

- (1) [Yuki Imura](#), Yasuyuki Asano, Kiichi Sato, Etsuro Yoshimura: *Anal. Sci.* **25**, 1403-1407 (2009).
- (2) [Yuki Imura](#), Kiichi Sato, Etsuro Yoshimura: *Anal. Chem.* **82**, 9983-9988 (2010).
- (3) [Yuki Imura](#), Etsuro Yoshimura, Kiichi Sato: *Anal. Sci.* **28**, 197-199 (2012).
- (4) [Yuki Imura](#), Etsuro Yoshimura, Kiichi Sato: *Anal. Chem.* **85**, 1683-1688 (2013).