

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 井村 祐己

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肝臓で代謝、腎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、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。本論文は生理活性物質の体内動態と生理活性を複合的に評価するシステムをマイクロチップ上に構築し、分析の微量化・迅速化・ハイスループット化を果たす分析デバイスを開発したものである。

第1章で背景を述べた後、第2章ではマイクロチップの作製方法など実験材料と手法を述べた。第3章にてマイクロチップ内で溶液を循環させる方法および細胞を培養する方法について述べた。マイクロチップ内で溶液を循環させるため、マイクロチップ搭載型のペリスタルティックポンプ（マイクロポンプ）を開発した。溶液を充填した流路から薄膜を隔てて直交する位置に空気により膨張させることが可能な制御用流路を四本並置し、加圧することにより溶液流路の一部を押しつぶした。制御用流路の加圧・減圧を繰り返すことにより溶液流路を蠕動させ、一方向への脈流を発生させた。チップ内で細胞を培養する方法については三通りの方法を検討した。良好に生育する細胞は、マイクロチップの基板であるスライドガラスをフィブロネクチンで修飾し、培養した。溶液のフローがストレスとなる細胞は、細胞培養マイクロキャリアーである Cytodex 上に細胞を培養し、マイクロチップへ充填することでストレスを低減させた。上皮様の細胞レイヤーを形成する細胞は、マイクロチップ内に設置した細胞培養支持膜上でコンフルエントとなるよう培養した。細胞の性質により、適したマイクロチップ内培養方法を構築することができた。

第4章では、生理活性物質に対する生体器官の機能評価を行うマイクロチップ分析システムの開発を行った。生理活性物質のバイオアッセイを行うときのターゲットとなる部位（標的部位）では、ヒト乳癌由来 MCF-7 細胞を培養した。生理活性物質による MCF-7 細胞の死滅や増殖促進が容易に観察できる、スライドガラス上に培養する構造とした。腸管における物質の選択的な吸収を模した腸上皮部位ではヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞を培養した。培養支持膜上で Caco-2 細胞はコンフルエントな細胞レイヤーを形成し、選択的な物質

透過を示した。肝臓における物質の代謝を模した肝臓部位では、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を使用した。Cytodex 上に HepG2 細胞を培養し、チップ内へ充填する方法により、高い代謝能を有する肝臓のマイクロモデルを作製することができた。消化液による消化を行う消化管部位では人口胃液・人口腸液を用いて、サンプルに対する崩壊試験を行った。タンパク質およびトリグリセリドの分解を行うことができる構造とした。糸球体における血中成分の濾過を模した腎臓部位では、透析膜を使用して低分子の透過を行うことができる構造とした。試料溶液にタンパク質を添加することにより、タンパク質との結合を考慮に入れた透過システムを開発した。

第5章で、第4章にて開発した模擬臓器を複数搭載した、複合的バイオアッセイチップの開発を行った。腸上皮・肝臓・標的部位を一つのチップに直列に搭載することで、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できるシステムを開発した。また、このシステムの上流に消化管部位を搭載し、消化・吸収・代謝を考慮した上でバイオアッセイを行うシステムを開発した。更に、マイクロポンプによって溶液駆動が行われる閉鎖流路の一部に腎臓・標的部位を設置し、流路内の物質が経時的に排出される環境下で、物質のタンパク質結合による残留性を考慮したバイオアッセイシステムを開発した。第6章で研究のまとめと、今後の課題・展望について議論を行った。

以上本研究は、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マイクロシステム、および残留性とバイオアクティビティを複合的に評価するマイクロシステムを開発し、分析の微量化・迅速化を行ったものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の論文として価値あるものと認めた。