

(2A)-2 細胞の立体構造形成プロセスの開発

(2A)-2-1 ガス透過性素材と細胞外マトリクスを組合わせた肝細胞の高効率極性誘導培養プロセスの開発

(2A)-2-1-1 導入

本研究では、医薬品候補化合物の代謝様式や動態の予測を、培養細胞を用いた試験管系で行えるデバイスを目指して、肝細胞を含む様々な細胞を立体的に組み立てて、デバイス上で機能的な 3 次元ヘテロ肝臓組織を形成するプロセスを開発する。

前年度は開発の指標となる CYP およびトランスポーター活性の測定プロセスの整備および測定値を、従来の *in vitro* 試験系を用いて得た。具体的には、7-benzyloxyquinoline を用いた CYP3A4 活性の測定、 $[^3\text{H}]$ Estrone-3-sulfate を用いた OATP 活性の測定、CDCF を用いた MRP2 活性の測定である。これに加えて、CDCF を用いた毛細胆管の画像解析、および MRP2 抗体を用いた MRP2 局在解析のプロセスおよび背景データを取得した。

肝細胞は肝臓から単離された肝細胞は胆汁排出活性やトランスポーターの局在といった極性を失っており、培養環境に置かれると直ちに持っていた代謝活性やトランスポーター活性も著しく低下する。これらは上記、「医薬品候補化合物の代謝様式や動態の予測を、培養細胞を用いた試験管系で行えるデバイス」の開発のために求められる性能である。これを回避するために有効な手段の一つとして、サンドイッチ培養が広く一般的に知られている。

一方、肝細胞は非常に多くの酸素を消費することが知られており、生体肝臓においては 2000nmol/mL の供給される酸素がこれを賄っているが、培養系で供給される酸素量は 200nmol/mL である。したがって、培養における肝細胞機能の再獲得や維持のために、培養環境を高酸素にすることが提案されているが、今までその手段や利点を示す明確な知見はない。

(2A)-2-1-2 今年度実施項目

【実施項目】蛍光基質などを利用した肝細胞等の輸送活性の計測と薬物トランスポータータンパク質の局在解析を行う。

本研究課題では酸素透過性膜を底面に配した培養プレートにより、接着した肝細胞に直接高酸素を供給しながら培養するプロセスの検討を、蛍光基質などを利用した胆汁排出活性および薬物トランスポーターの局在を指標として行った。

(2A)-2-1-3 実験操作

a. 肝細胞の調製

ア. 溶液の準備

【前灌流液】

*組成	1×液	10×液
NaCl	8.0 g/L	80 g/L
KCl	0.40	4.0
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.078	0.78
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.151	1.51
glucose	0.90	9.0
EGTA	0.38	3.8
EDTA	0.745	7.45
Ph.Red	0.006	0.060
HEPES	2.38	23.8
NaHCO ₃	0.35	3.5

*10× Stock sol.は、20回分、1Lずつ調製する。NaClからHEPESまでを10×濃度溶かし、0.2%Ph.Redを30 mL加えて1Lにし、ポリビンにいれ、CHCl₃ 4.0 mLを加え、室温保存。

*1×液は、100 mLとり1Lにし、500 mLずつ広口ビンに分注し、オートクレーブ。

*使用直前に、500 mLあたり、

7.5% NaHCO₃ 2.35 mL

を加え、1N NaOHでpH7.2程度に調整する。約1.5-2.0 mLの添加となる。

【コラゲナーゼ液】

*組成

NaCl	8.0 g/L
KCl	0.40
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	0.078
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.151
HEPES	2.38
Ph. Red	0.006

CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.74
NaHCO ₃	0.35
Trypsin inhibitor(Sig. TypeII-S)	0.050
Collagenase (和光の細胞分散用)	0.50

*NaHCO₃ までを溶かした液を 1L ずつ調製し、4°Cで保存しておく.

*使用直前にそのうち、400 mL をとり Trypsin Inhibitor と collagenase を添加して調製する.

まず、Trypsin inhibitor 20 mg をゆっくりと溶かす. ここで 1N NaOH を加え、pH7.2-7.4 に調整する. Collagenase 200 mg を攪拌しながらゆっくりと溶かす. コラゲナーゼ粉末が表面に分散した状態で静かに溶解させる. 決して団子状に固まらせない. すべて添加してから 1hr 攪はん後、NaOH で pH を正確に 7.60 に調整する. 必要ならば、pH メーターの較正を行う.

*コーニングディスポーザブルボトルトップフィルターで濾過する.

【L-15 培地】 4°C 保存、1 カ月以内に使用

L-15 培地 (L-15Medium Leibovitz's DIBCO 11415) 500ml に

ペニシリンーストレプトマイシンーグルタミン (invitrogen#10378016) 5mL

BSA 1 g

Hepes 214.5mg

インシュリン (10⁻⁴M) 570μL

を加え濾過滅菌する

【Rat Hepa 用培地の調製】 使用事に必要分だけ調製

D-MEM(Low-グルコース) 500ML

ペニシリンーストレプトマイシンーグルタミン (invitrogen#10378016) 5mL

非働化血清 50ml

Hepes 214.5mg

EGF (10⁻⁴M) 570μL

デキサメサゾン (10⁻³ M) 57μL

インシュリン (10⁻⁴M) 570μL

イ. 解剖

*開腹から 2hr 以内に細胞を播種し終わることが望ましいが、氷浴保存が良好であるならば、少なくとも 3hr 以内ならば、さほど問題はない。

*均一な灌流と十分な消化ができれば、収量・生存率ともに良い結果が得られる。適量のネンブタールと確実な腹腔内投与（失敗すると、体温低下・血管の収縮等を招く）、門脈チューブの方向及び固定位置（均一な灌流はこれで決まる）、温浴による温度保持（コラゲナーゼの活性に重大な影響を与える）、そして全体としての解剖のスピード等が重要なファクターであると思われる。

- ・ラットの体重 $W(g)$ を測定し、次式によりネンブタール量 $V(mL)$ を決定する。

$$V = 0.0014 \cdot W$$

- ・軍手でラットをつかみ（エーテル麻酔可）腹腔内にネンブタールを確実に注射。
- ・約 5 min 後、下肢を刺激し、深麻酔期にあることを確認。
- ・ラットを解剖台にのせる。（厚めの JK ワイパーやベンコットなどを背中の下に入れると解剖がしやすい。）
- ・解剖用手袋をして、十分な量のエタノールで腹部をよく消毒する。
- ・片鋭で皮膚を喉元まで切開し、露出した筋層をアルコール綿で消毒する。
- ・腹筋を大きく切開し、肋骨陥状突起を切り取る。固く絞ったアルコール綿で腸を腹腔右側に出し、肝臓を上方に寄せる。
- ・下大静脈結さつ位置周辺の脂肪を歯科用ピンセットで引っ張ってとる。
- ・2本のピンセットで穴を開け、縫合糸を通しループをつくる。歯科用ピンセットの鋭い先端を利用するとよい（血管を破らないように注意）。
- ・門脈結さつ位置の脂肪をピンセットで丹念にほぐし、縫合糸を通しループをつくる。
- ・ラットを左手で持ち、両鋭で門脈を確実に半切し、液で血液を流しながら往路用チューブを挿入。そのままラットを降ろし、チューブの方向を門脈の自然な方向と一致させ、テープでコルク板に固定。ループを縛る。均一な灌流の実現は、チューブ先端と門脈分岐点の相対位置で決定される。分岐点を越えて挿入されていると均一な灌流がなされない。可能ならば脱血の様子を見ながら、微妙に位置を調整するとよい。
- ・すぐに下大静脈を切断する。
- ・チューブをテープでしっかりと固定し、これ以降は、決してラットに触れない。
- ・前灌流液でさらに 5 min 灌流
- ・ポンプを止めて、空気を入れないようにコラゲナーゼ液に替える。この際、往

路チューブをコラゲナーゼ液に替えて約 1 min 後に復路チューブをコラゲナーゼ液のビンに入れる。これは、前灌流液中の EDTA と EGTA によるコラゲナーゼ液中の Ca^{2+} の取り込みを防止するためである。コラゲナーゼ液を約 20 mL 残し消化を停止する。約 7-8 min 消化できる。

- ・間膜を切りながらピンセットで肝臓をつまみ上げ、余分な体液を極力切り、ディッシュに移す。このとき内臓を傷つけると、細菌汚染の原因となるので注意。

- ・ディッシュをよく消毒後、クリーンベンチに持込む。以下精製操作。

ウ. 実質細胞の精製

- *遠心機は 0°C にセットしておく。

- *クリーンベンチに氷浴を持ち込み、イーグル MEM 500 mL を置いておく。

- *錆びたメスによる切断は生存率を著しく落ため、必要ならば刃を交換しておく。

- *ピペッティングは、なるべく先端口径の大きい 25ml または 50 mL ディスポーザブルピペットを用いる。(特に採取直後)

- *ディッシュ内消化用に、イーグル MEM 約 20 mL を別にとり、室温においておく。

- *非実質細胞の同時精製は、他の文献を参考の事。

- ・肝臓を入れたペトリディッシュに、残りのコラゲナーゼ液約 20 mL と室温イーグル MEM 約 20 ml を加える (分量はおおよそでよい)。

- ・肝臓に 2 本のメスで丁寧に切る。一方で押え、一方で切断する感じ。十字に細かく切る。

- ・ピンセットで未消化片をほぐす。丁寧に回数を多く。

- ・15 min (ディッシュ内消化)。 37°C CO_2 インキュベーター内で行う。巡回シェーカー上で緩やかに揺るとよい。

- ・この間に、採取に用いた器具や死体をかたづける。

- ・ピンセットで未消化片をほぐす。丁寧に回数を多く。残った未消化片はピペッティングの障害となるため、大胆に取り除いてしまう。

- ・25 mL ピペットで 3-5 回ピペッティング。

- ・氷浴においた 1 重ガーゼ付きビーカーで濾過。濾液が少ない時は、氷浴イーグル MEM で 40 mL まで増やす。これ以降は、極力温度を上げない。

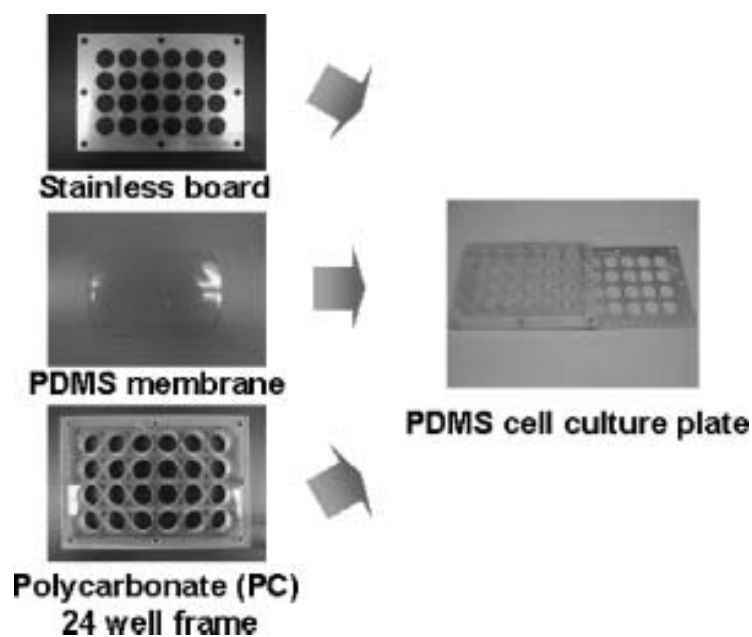
- ・同様に、2 重ガーゼ付きビーカーで濾過し、2 本の 50 mL チューブに移す。氷浴イーグル MEM で、遠心管をいっぱいにする。

- ・ 640rpm, 1 min, 0°Cで遠心, 上清を捨てる。そして, イーグル MEM 10 mL 程度加え, 再懸濁させた後, イーグル MEM 40 mL を加える (計 50 mL)。細胞の収量がほしい場合は, 吸引針ではなくピペットで上清を捨てる, 若干改善される。
- ・ 十字左右に混ぜながら遠沈管 2 本を 1 本にする。
- ・ 2 重メッシュ付き細胞濾過器に細胞を通す
- ・ イーグル MEM を加え 50ml にする。
- ・ 640rpm, 1 min, 0°Cで遠心, 上清を捨てる。
- ・ L-15 培地 (調製方法は前述) 25ml+パーコール液 (シグマ) 21.6ml+10* HBSSHank's Balanced Salt solution(Invitrogen) 2.4ml を加える
- ・ 640rpm,10min 0°Cで遠心 上清を捨てる。
- ・ イーグル MEM に懸濁
- ・ 640rpm, 2 min, 0°Cで遠心
- ・ イーグル MEM に懸濁
- ・ 640rpm, 2 min, 0°Cで遠心
- ・ 遠心の後, RatHepa 用培地に再懸濁。
- ・ 懸濁液をよく混合し 0.2 mL サンプリングを 2 回行い, 等量の 0.4%トリパンブルー液を加え, 細胞数と生存率を測定する。細胞の生存率は 85%以上のものを用いた。細胞濃度は 4×10^5 cells/mL に調整した。

b. 高酸素および低酸素培養システム

ア. ポリジメチルシロキサン (PDMS) 膜による酸素透過性膜プレート(PDMS膜プレート)

約 1mm 厚の PDMS 膜をポリカーボネート製の枠とステンレス製の押さえ板で挟んで PDMS 膜プレートを作製した (図①-(2A)-2-1.1)。PDMS 膜はダウ・コーニング社製の Silpot184 を購入して、PDMS プレポリマーと硬化剤を 10:1 の割合で混合し、プラスチックボックス内で薄く広げ、75°Cで 2 時間加熱することによって、作製した。



図①-(2A)-2-1.1 PDMS 膜プレート

PDMS 膜へのコラーゲン共有結合は、O₂ プラズマ処理をした PDMS 膜にアミノシラン処理を行い、Thermo 社製の sulfosuccinimidyl 2-[m-azido-o-nitrobenzamido]ethyl-1, 3'-dithiopropionate (sulfo-SAND) を UV でクロスリンクさせたのち、新田ゼラチン社製のコラーゲンタイプ I-P 溶液を加え、一晚室温でおくことにより行った。PDMS 膜のコラーゲンコーティングは O₂ プラズマ処理をした PDMS 膜に対して、コラーゲン製品の説明書に従って行った。

イ. フルオロカーボン膜による酸素透過性膜プレート(Lumoxプレート)

フルオロカーボン膜による酸素透過性膜プレートは In vitro Systems & Services 社から 24well Lumox プレートを購入し、そこに PDMS 膜プレート同様のコラーゲンコート処理をして使用した。

ウ. 低酸素培養システム

日本 BD 社のコラーゲンコート 24well プレートを購入して使用した。これを PS (O₂-) とした。

c. 肝細胞のサンドイッチ培養

ア. コラーゲングルサンドイッチ

細胞の播種 2 時間後、コラーゲングル溶液を 100μl 重層して、37°C で 30 分放置した。0.1μM デキサメタゾン、0.1% インスリントランスフェリンセレンウム

塩を加えた William's medium E を 500 μ L 加えた。培地は 24 時間おきに交換した。

イ. マトリゲルサンドイッチ

細胞の播種 2 時間後、150 μ g/ml マトリゲルグロソファクターリデュースド、0.1 μ M デキサメタゾン、0.1% インスリントランスフェリンセレンウム塩を加えた William's medium E 500 μ L に培地を交換した。培地は 24 時間おきに交換した。

d. 機能的毛細胆管アッセイ

ア. 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein (CDCF)による毛細胆管イメージング

- ・培養を HEPES バッファ(0.35 g/L KCl, 0.25g/L MgSO₄, 0.18 g/L CaCl₂, 0.16 g/L KH₂PO₄, 4.8 g/L HEPES, 7.9 g/L NaCl, and 0.9 g/L glucose, pH 7.4)で 2 回洗浄した。
- ・1 μ M CDCF in HBSS で 30 分間、37°C, 5%CO₂ で培養した。
- ・HBSS バッファで 2 回洗浄した。
- ・OLYMPUS 社製 IX71 蛍光顕微鏡、および三次元バイオ試料観察装置を用いて鏡検した。

イ. CDCFによる排出トランスポーター活性測定

1) 溶液の準備

- ・Standard HBSS (37°C ウォーターバスで保温)

HBSS(Ca/Mg 入り) (Invitrogen, 14025-092)

- ・Ca/Mg-free HBSS (37°C ウォーターバスで保温)

HBSS(Ca/Mg-free) (Invitrogen, 14175-079)

10ml 50mL

100mM EGTA in HBSS

100 μ L 500 μ L

- ・CDCF 溶液

使用直前に Standard HBSS で 10mM CDCF ストック溶液 (in dimethyl sulfoxide: Molecular Probes, C-369)を希釈して 5 μ M CDCF 溶液を作成→37°C ウォーターバスで保温 (1, 2 時間以上置いておくと黄色く変色することから、まさに使用直前に調製すること。)

- ・0.5% Triton X-100 in PBS (室温保存)

- BCA protein assay kit (PIERCE、23227)

2) 化合物適用・回収操作 (24 穴プレートの場合) ひとつの条件において standard と Ca-free HBSS で活性測定する。

- メディウムをアスピレーターで除去
- 37°C ウォーターバス中の Standard or Ca/Mg²⁺-free HBSS バッファを 5mL のピペットと電動ピペッターでウェルの壁沿いに 0.5mL ずつ注ぐ。
- アスピレーターで除去 (これを 2 回繰り返す)
- 37°C ウォーターバス中の Standard or Ca/Mg²⁺-free HBSS バッファを 5mL のピペットと電動ピペッターでウェルの壁沿いに 0.5mL ずつ注ぐ。
- 37°C の CO₂ インキュベーターで 10 分間インキュベート。
- アスピレーターで除去
- 温めておいた CDCF 溶液を 1mL ピペットマンで 500μL ずつウェルの壁沿いに注ぐ
- 37°C の CO₂ インキュベーターで 15 分間インキュベート
- アスピレーターで除去
- 温めておいた Standard HBSS バッファ 0.5mL を 5mL のピペットと電動ピペッターでウェルの壁沿いに注ぐ。
- アスピレーターで除去 (これを 2 回繰り返す)
- 温めておいた Standard HBSS バッファ 0.5mL を 5mL のピペットと電動ピペッターでウェルの壁沿いに注ぐ。
- 37°C の CO₂ インキュベーターで 15 分間インキュベート
- アスピレーターで除去
- 1mL ピペットマンで 500μL ずつ 0.5% Triton X-100 in PBS をウェルの壁沿いに注ぐ
- 25°C 20 分間ローテーター (回転数 120rpm) で揺する。
- 液を回収
- 13000 x g, 10 分、4°C で遠心して、上清を 1.5mL チューブに回収。(-20°C、暗所保存)
- 100μL をマルチウェルプレートに入れて、励起 492nm、蛍光 530nm を計測する。

- ・ 25 μ L を用いて BCA アッセイによりタンパク量を計測する。

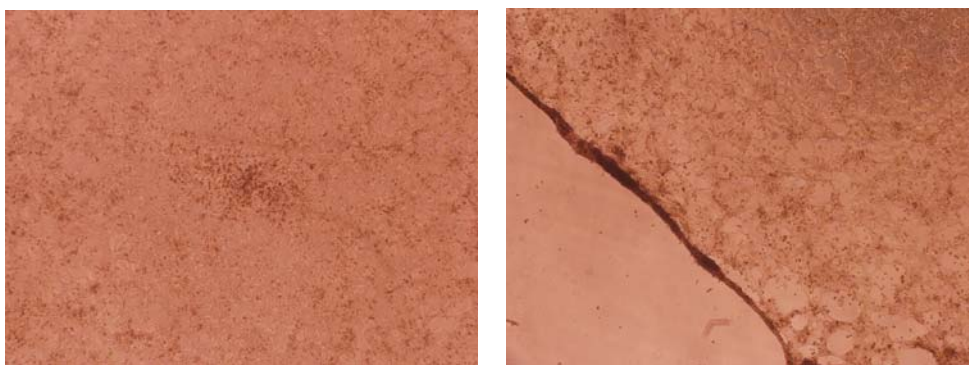
e. 極性タンパクの局在解析

- ・ PBS で培養を 2 回洗浄する
- ・ 4%パラホルムアルデヒド/PBS で 5 分固定
- ・ PBS で培養を 3 回洗浄した。
- ・ PBS を除く
- ・ ブロッキングバッファ(1% BSA, 0.05%TritonX-100 in PBS)で 60 分、室温放置
- ・ ブロッキングバッファを除く
- ・ 一次抗体をブロッキングバッファで希釈した液を 200 μ L 加え 120 分、室温放置
- ・ PBS で培養を 3 回洗浄した。
- ・ PBS を除く
- ・ 二次抗体(Molecular probes)をブロッキングバッファで 500 倍希釈した液を 200 μ L 加え 60 分、暗所室温放置
- ・ PBS で培養を 3 回洗浄した。
- ・ PBS を除く
- ・ DAPI で核を染色
- ・ マウント
- ・ 鏡検

(2A)-2-1-4 実験結果

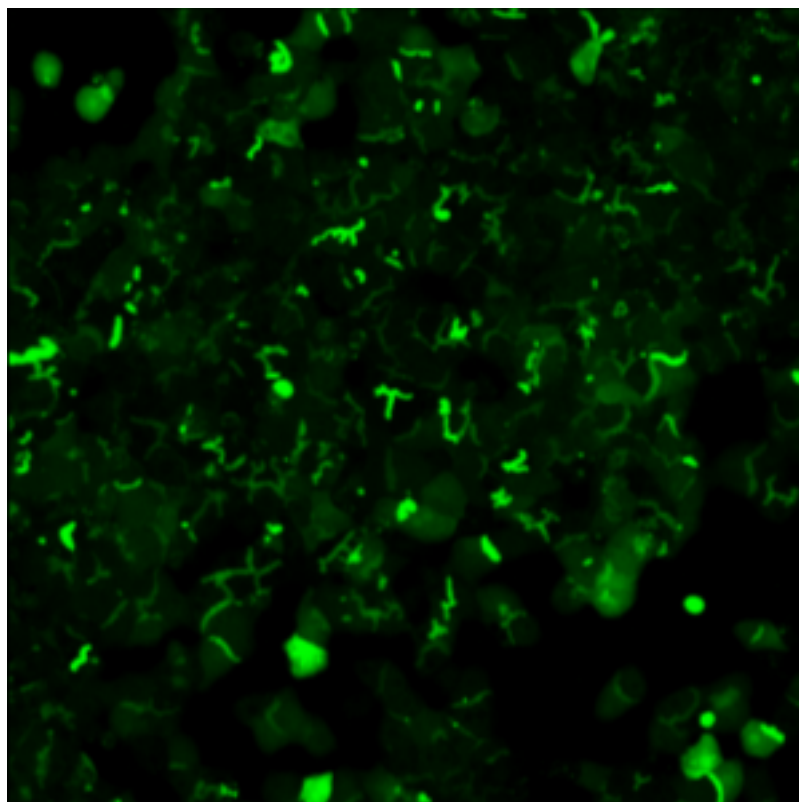
a. PDMS膜上でのコラーゲンゲルサンドイッチ培養

まず、コラーゲンを共有結合させた PDMS 膜プレートとコラーゲンを吸着結合（コーティング）した PDMS 膜プレートを用意して、これに肝細胞を播種したのち、24 時間後にコラーゲンを重層した。培養 5 日目の様子を顕微鏡で観察した結果が図①-(2A)-2-1.2 である。



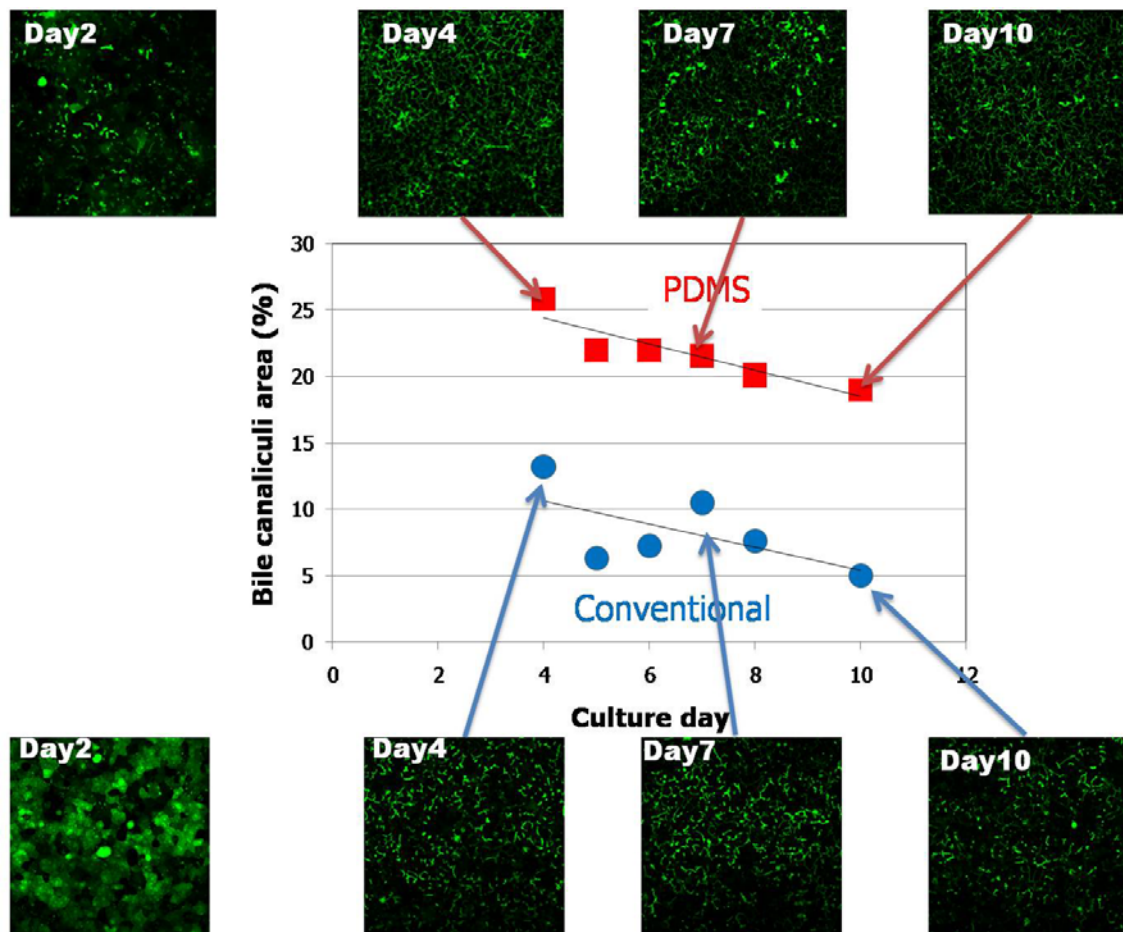
図①-(2A)-2-1.2 PDMS 膜上でのコラーゲンゲルサンドイッチ培養結果，左、共有結合、右、コーティング

共有結合では細胞の顕著な剥離はないが、コーティングでは細胞層がめくれている部分や、細胞と細胞の間に広い間隙が目立つ。この結果から、コラーゲンを共有結合させたほうがコーティングよりもよい。しかしながら、図①-(2A)-2-1.3に示すように、5日より短い期間の培養では、機能的な毛細胆管が維持されているため、コラーゲンコーティングでもよい。



図①-(2A)-2-1.3 コラーゲンコーティング PDMS 膜上のコラーゲンゲルサンドイッチ培養による機能的毛細胆管形成

次に、コラーゲンを共有結合させた PDMS 膜プレートで肝細胞をコラーゲンゲルによってサンドイッチ培養した場合の、機能的毛細胆管形成を CDCF を用いて解析した。播種した日を 0 日目、コラーゲンを重層したのを 1 日目とすると、培養 10 日目までの機能的毛細胆管の形成は図①-(2A)-2-1.4 のようになった。



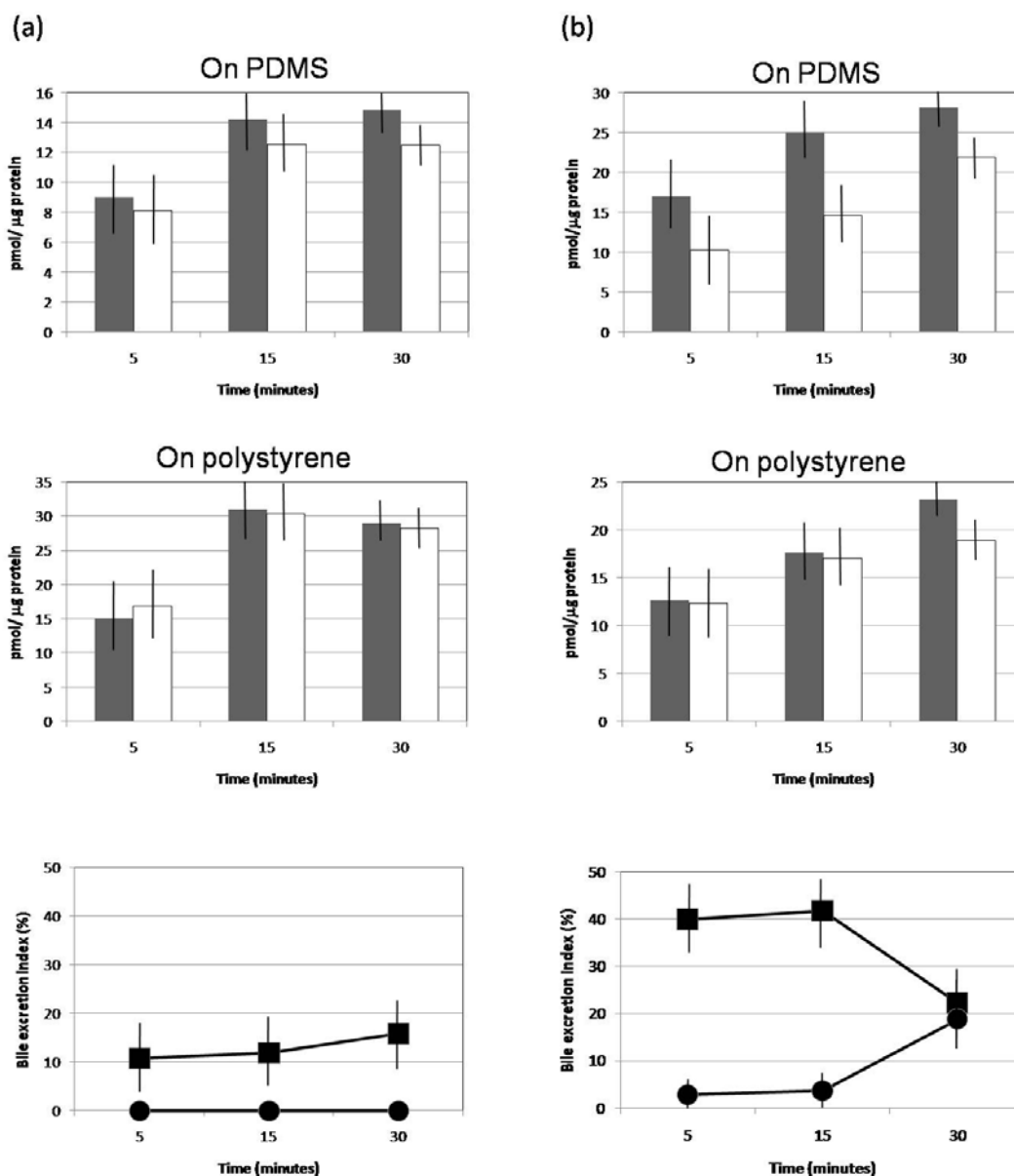
図①-(2A)-2-1.4

PDMS 膜プレートでは 2 日目から蛍光基質が蓄積した毛細胆管の形成がはっきりとしており、その形態が 10 日目まで維持された。一方、PS(O₂-)では 2 日目は細胞内への蓄積が顕著で、毛細胆管の形成はほとんど見られず、4 日目から毛細胆管の形成が見られた。機能的毛細胆管を定量するため、培養 4 日目以降の CDCF の蛍光蓄積面積を定量して、撮影面積に占める割合として示した。その結果から、明らかに PDMS 膜上の肝細胞のほうが PS(O₂-)より広範囲に機能的毛細胆管が形成されていた。さらにこれは培養 10 日目まで維持された。

胆汁排出活性を定量的に評価するため、Bile excretion index (BEI) を測定した。

(図①-(2A)-2-1.5) BEI は毛細胆管に排出された代謝物量が培養中に含まれる代謝物量全体に占める割合を示す。毛細胆管の量を示す指標として使われ、次の式(①-21)により算出される。

$$BEI = \frac{\text{Accumulation (Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}(+)) - \text{Accumulation (Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}(-))}{\text{Accumulation (Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}(+)}) \cdot 100 \quad (\text{①-21})$$



図①-(2A)-2-1.5 (a) 培養 2 日目 (b) 培養 4 日目の BEI。

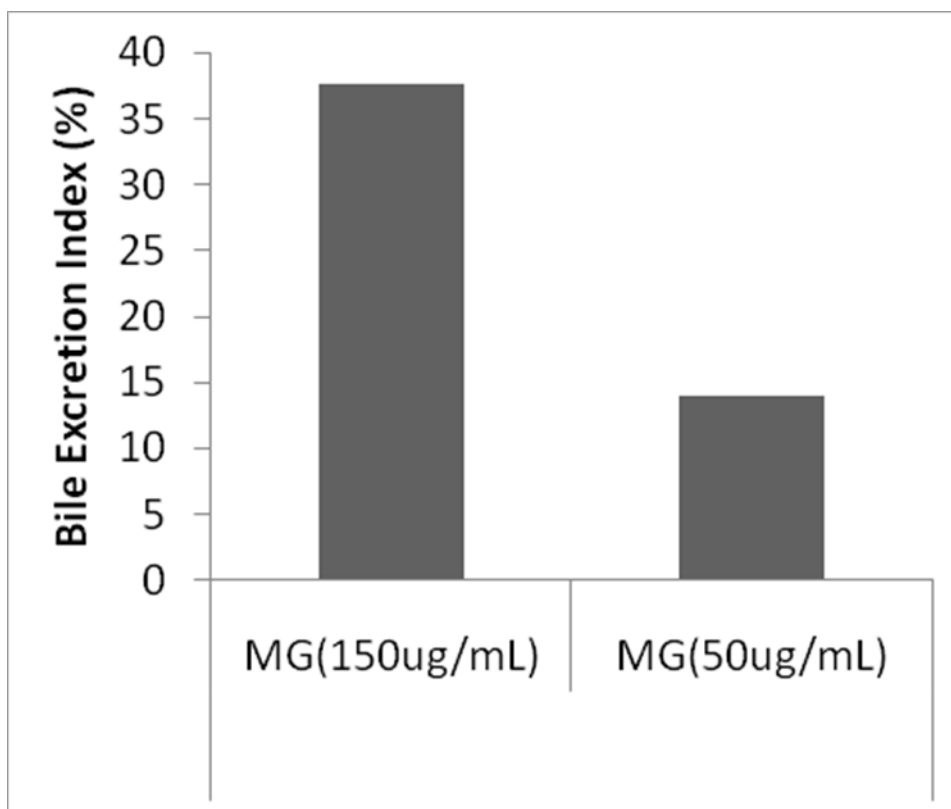
●PS(O₂-) ■PDMS 膜プレート

培養2日目と4日目においてPDMS膜プレート上の肝細胞のほうがより高いBEIを示した。

これらの結果から、培養2日目から10日目まで、PDMS膜プレートを用いて肝細胞の毛細胆管機能を従来方法より効率よく解析することができる。

b. PDMS膜上でのマトリゲルサンドイッチ培養

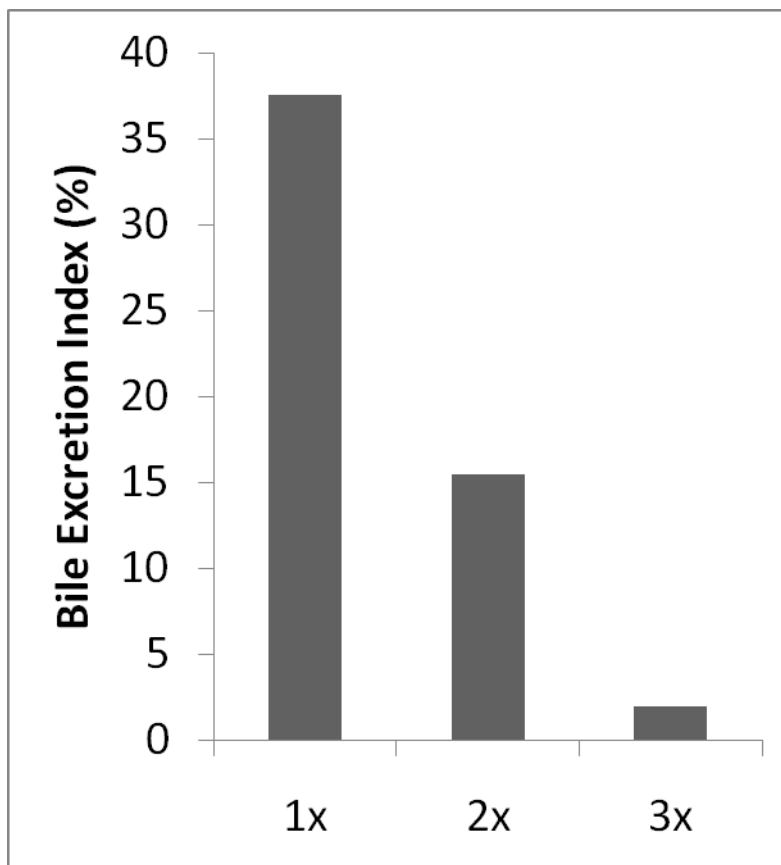
PDMS膜プレート上で肝細胞のマトリゲルによるサンドイッチ培養を行うプロセス検討を行った。まず、コラーゲンをコーティングしたPDMS膜プレートで細胞播種密度 1×10^5 cells/mL のときの最適なマトリゲルの濃度を培養2日目のBEIを指標として検討した (図①-(2A)-2-1.6)。



図①-(2A)-2-1.6 マトリゲル強度と BEI の関係

マトリゲル濃度 50 μ g/mL と 150 μ g/mL で検討したところ、150 μ g/mL のほうがより高い BEI だった。

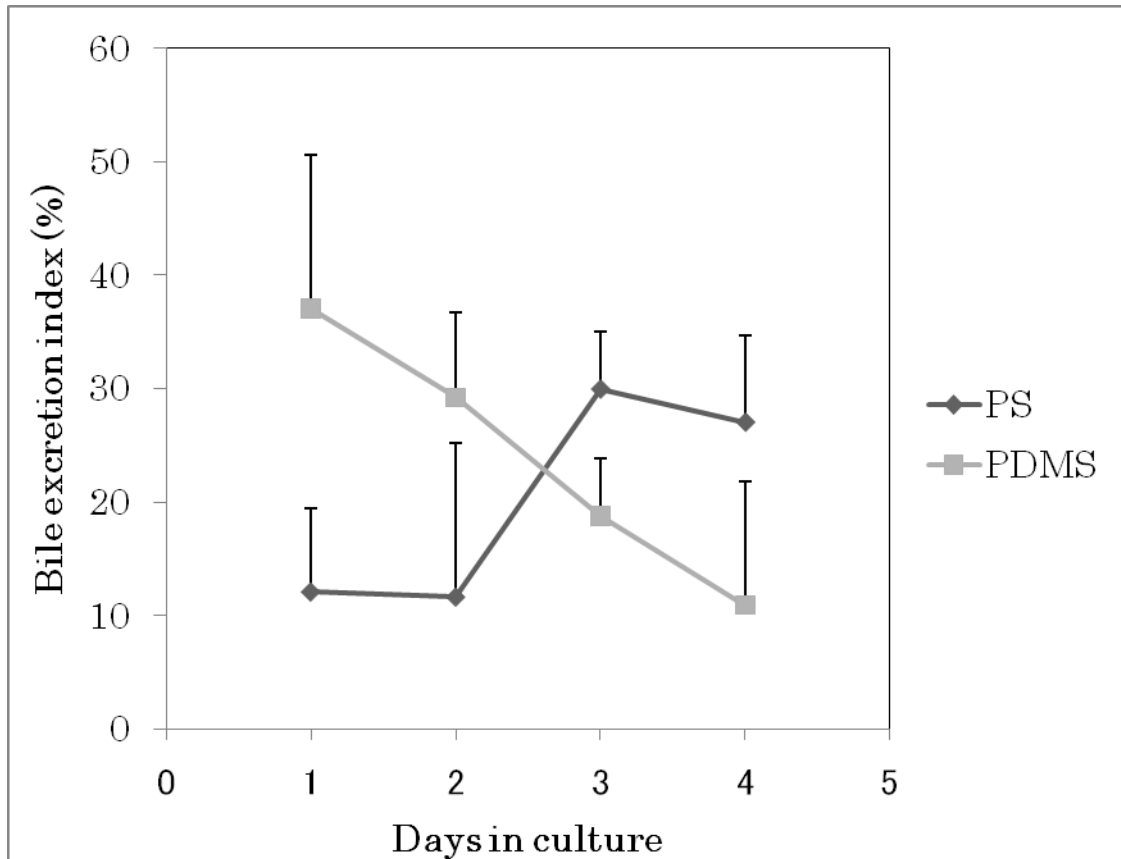
次に、コラーゲンをコーティングした PDMS 膜プレート、マトリゲル濃度 150 μ g/mL で、最適細胞播種密度を培養 2 日目の BEI を指標として検討した(図①-(2A)-2-1.7)。



図①-(2A)-2-1.7 細胞播種密度と BEI の関係

細胞播種密度を 1 \times , 2 \times , 3 $\times 10^5$ cells/cm² として検討したところ、1 $\times 10^5$ cells/cm² が最も高い BEI であった。

続いて、次に、コラーゲンをコーティングした PDMS 膜プレート、マトリゲル濃度 150 μ g/mL、細胞初期播種密度 1 $\times 10^5$ cells/cm² で、最適培養期間を BEI を指標として検討した(図①-(2A)-2-1.8)。

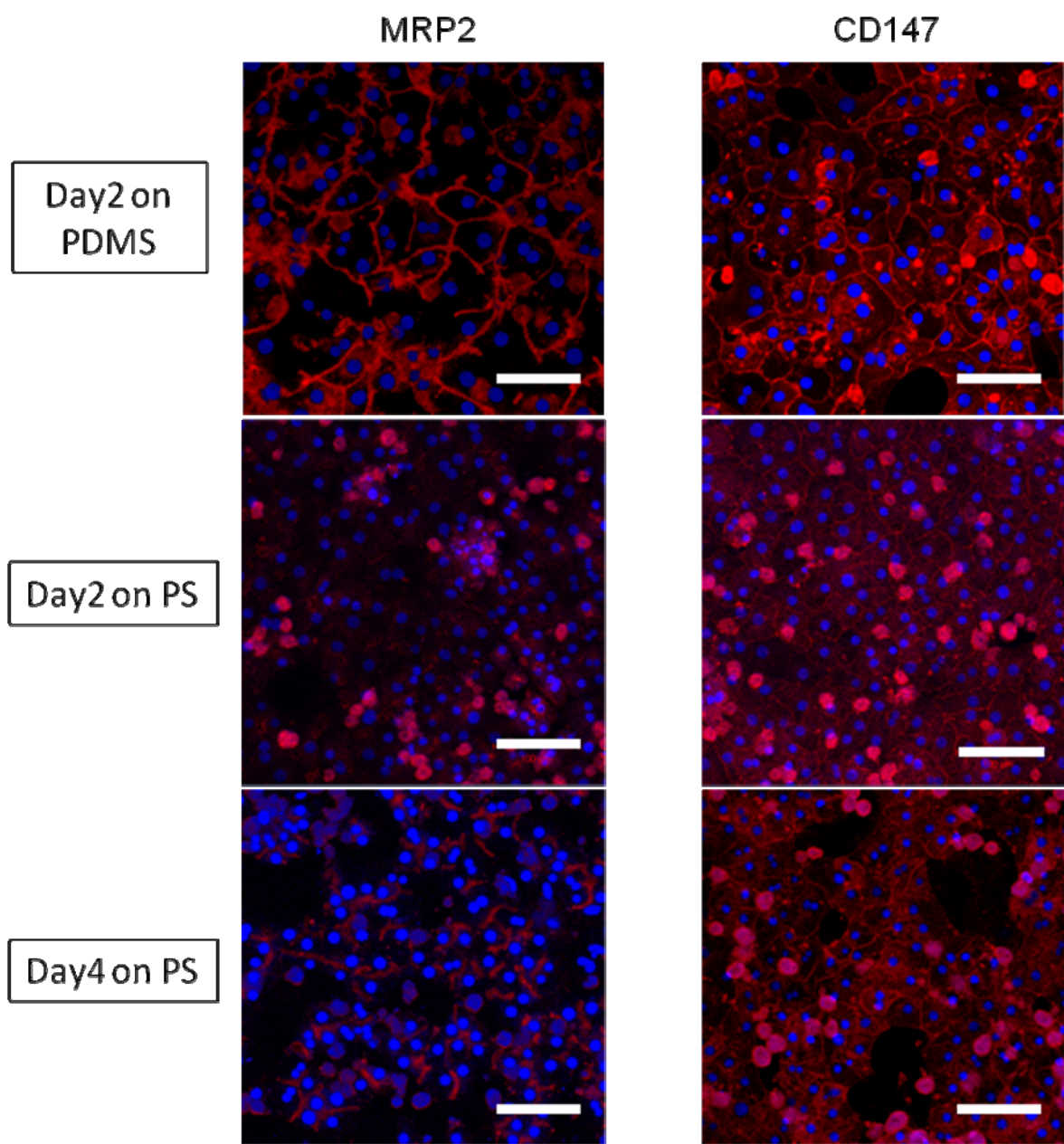


図①-(2A)-2-1.8 培養期間と BEI の関係

培養 1 日目および 2 日目において、PDMS 膜プレート上の肝細胞は従来法よりも高い BEI を示した。

以上の結果をまとめると、コラーゲンコートした PDMS 膜プレートで肝細胞のマトリゲルサンドイッチ培養により機能的毛細胆管を解析する際には、細胞播種密度 $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ の肝細胞に $150 \mu\text{g/mL}$ のマトリゲルを重層して、培養 1 日目、2 日目が最適である。

続いて、上記の最適条件時における、排出トランスポータータンパク MRP2 の発現局在解析を行った。MRP2 は極性をもった肝細胞の毛細胆管膜側に発現局在することが知られている。極性を持った肝細胞の基底膜側に発現局在することが知られている CD147 の解析も同時に行った。(図①-(2A)-2-1.9)

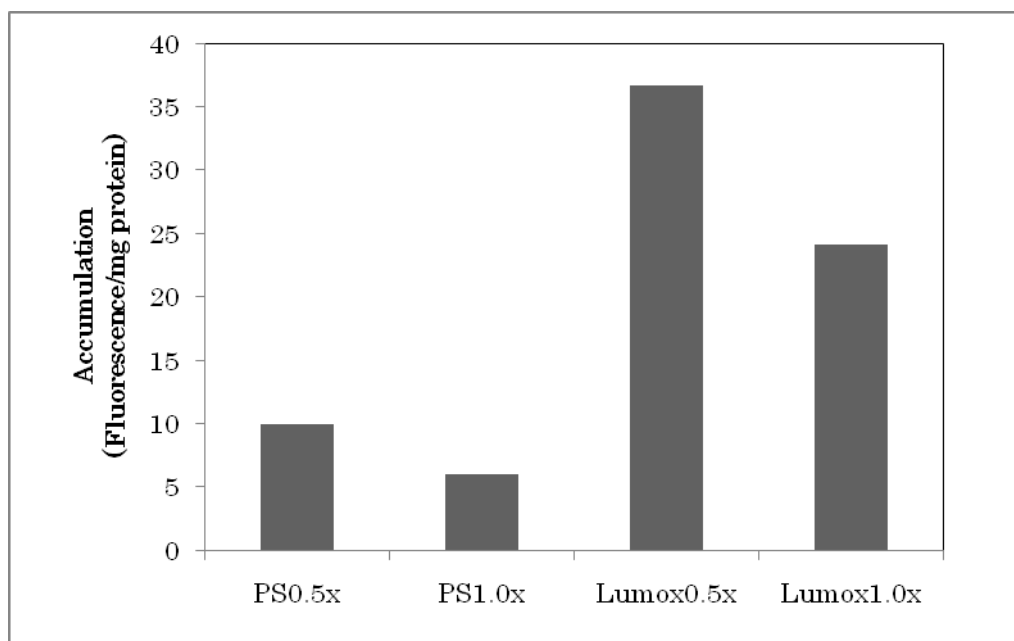


図①-(2A)-2-1.9 排出トランスポートタンパク質(Mrp2)と CD147 の発現局在状態

PDMS 膜上の肝細胞は培養 2 日目で Mrp2 および CD147 の局在が鮮明に見られることから、極性が形成されていることがわかった。同時期の PS(O₂-)の培養では Mrp2 の鮮明な発現局在は見られなかった。PS(O₂-)の培養 4 日目の極性肝細胞と比較すると、PDMS 膜上の肝細胞では Mrp2 がより広い範囲に発現局在していることがわかった。

c. フルオロカーボン膜上でのマトリゲルサンドイッチ培養

酸素透過性をもつフルオロカーボン膜上での胆汁排出活性と極性形成評価を行うため、Lumox プレート上に肝細胞を 0.5×10^5 cells/cm²、 1.0×10^5 cells/cm² で播種して、150 μ g/mL のマトリゲル培地でサンドイッチ培養を行い、培養 2 日目の BEI で評価を行った (図①-(2A)-2-1.10)。



図①-(2A)-2-1.10 PS および Lumox プレートにおける細胞播種密度と BEI の関係

Lumox プレートで 150 μ g/mL のマトリゲルを用いて極性をもった肝細胞の胆汁排出活性を解析するに最適な肝細胞播種密度条件は 0.5×10^5 cells/cm² であることがわかった。このとき PS(O₂-)と比較して 3.5 倍の BEI 値を示す。

(2A)-2-1-5 まとめ

【実施項目】 蛍光基質などを利用した肝細胞等の輸送活性の計測と薬物トランスポータータンパク質の局在解析を行う。

【結果】 酸素透過性膜を底面に配した培養プレートにより、接着した肝細胞に直接高酸素を供給しながら培養するプロセスの検討を、蛍光基質などを利用した胆汁排出活性および薬物トランスポーターの局在を指標として行った。その結果、PDMS 膜プレートを用いた場合、およびフルオロカーボン膜を用いた場合につい

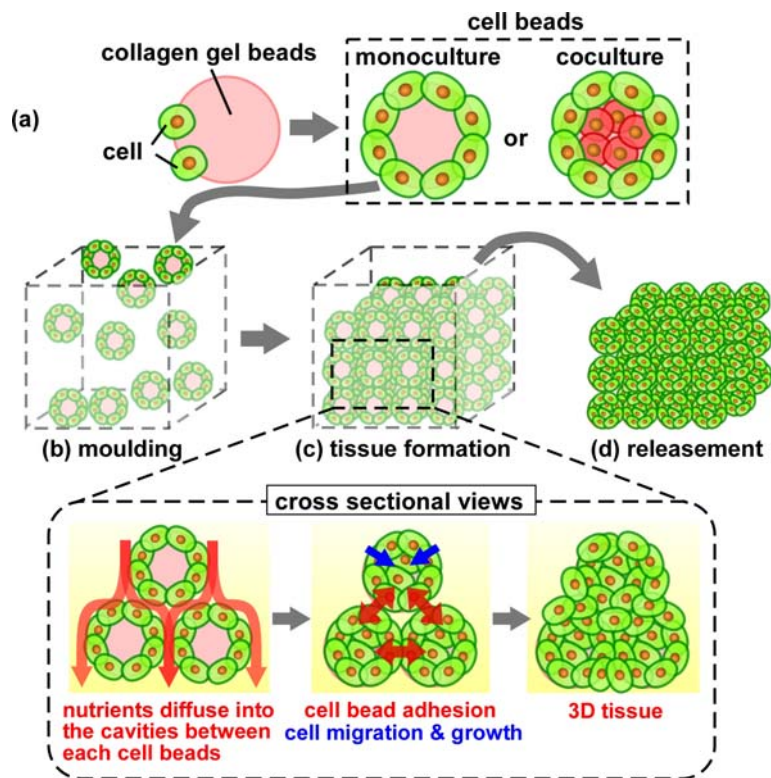
での最適な培養プロセスを見出すことができた。この成果は今後の医薬品候補化合物の代謝様式や動態の予測を、培養細胞を用いた試験管系で行えるデバイスの開発に役立つ。

(2A)-2-2 細胞ビーズによる組織構築法のためのコラーゲンゲルビーズ大量生産プロセス技術の開発

(2A)-2-2-1 概要

前年度に細胞ビーズによる細胞の立体構造形成プロセス法を開発し報告した(図①-(2A)-2-2.1)。細胞ビーズによる三次元立体組織形成の特長には下記の項目が挙げられる。

1. マクロスケールの組織を短時間で作製できる。
2. 三次元マイクロ流路で作製されるコラーゲンゲルビーズは、大きさを任意に制御できるため、細胞ビーズ1個あたりの細胞密度を精密に制御することができ、結果的に均一な三次元組織を作製できる。
3. 複数種の細胞ビーズを組み合わせることでヘテロ組織構造の設計が容易である。



図①-(2A)-2-2.1 細胞ビーズを用いたモルディング法による三次元組織構築

本法の最も大きな特長は、1のマクロスケールの組織を短時間作製できる点であるが、大型の組織形成には、大量の細胞ビーズを必要とするため、安定して大量にコラーゲンビーズを加工できる条件の確立が必須である。

【従来のコラーゲンビーズ作製方法】

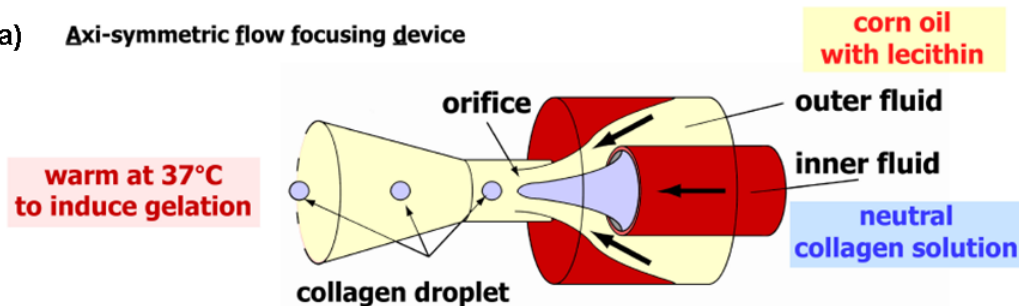
これまでのコラーゲンビーズ作製方法を図①-(2A)-2-2.2 に示す。まず、三次元マイクロ流路に、シリンジポンプで2%のレシチンを含むコーンオイル（外層）と中性コラーゲン溶液（内層）を流し、均一液滴を作る。形成されたコラーゲン液滴を、2 mL チューブに採取する。中性コラーゲンは、加温するとゲル化する性質をもつため、このチューブを40分間37°Cで加温しゲル化させる。その後、遠心分離によりオイル層を除き、培養液を加えることでコラーゲンゲルビーズを得た。

従来の方では、コラーゲンがゲル化しない、長時間の合成では粒径が変化してしまう、ゲルの保存（1-2週間）ができないなどの問題点があった。そこで、本年度は、安定して大量にコラーゲンビーズを加工する方法について検討を行った。

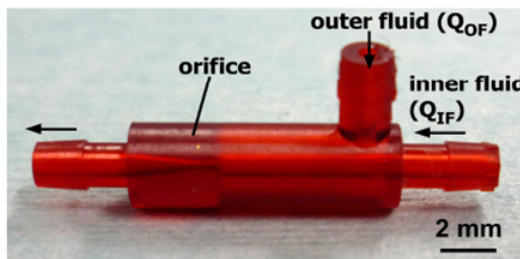
表①-(2A)-2-2.1 三次元マイクロ流路を用いたコラーゲンビーズの作製における問題点

従来法における問題点	考えられる要因
コラーゲン溶液がゲル化しない	コラーゲンのロット、プロセスの温度管理
長時間のプロセスで粒径が変化する	シリンジ内のコラーゲン溶液のゲル化
4°Cで保存するとゲル化する	中性コラーゲンゲルの特徴

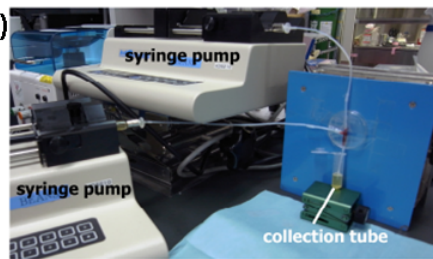
a) Axi-symmetric flow focusing device



b)



c)



図①-(2A)-2-2.2 三次元マイクロ流路によるコラーゲンビーズ作製 a) 液滴形成メカニズム, b) 三次元マイクロ流路, c) デバイスセットアップ

【実施項目 1】

3次元ヘテロ関連実験装置を導入し、 コラーゲンゲルの加工条件を決定する.

(2A)-2-2-2 実験方法

a. コラーゲンビーズの大量合成

図①-(2A)-2-2.3 に使用したコラーゲン溶液を示す。

【試薬・器具・装置】

(株)高研製中性コラーゲン溶液: DME-02, 2 gm/mL

2w/w%大豆レシチン in corn oil (以下コーンオイル)

2w/w%span80 in n-hexadecane (以下ヘキサデカン)

0.1w/w%tween20

1%AB in DMEM (以下 DMEM)

1%AB in DMEM (以下無血清 DMEM)

ガスタイトシリンジ (大量生産 : 1mL,10mL 少量 : 250 μ L,1mL)

シリンジポンプ : KDS210 2台

恒温槽 1台



図①-(2A)-2-2.3 使用した (株) 高研製中性コラーゲン溶液

【コラーゲン溶液の調製】

1. -20 $^{\circ}$ C保存されているアテロコラーゲンを解凍し, 5.0 μ m のフィルターでフィルトレーション.
2. 1.5mL チューブに 1 mL ずつ分注し, -20 $^{\circ}$ Cで保存する.
3. すぐ使用する場合は氷中保存. 長期保存する場合は-20 $^{\circ}$ C保存.

*中性コラーゲンは温まると固まるので、4℃以下で取り扱う。

【コラーゲンビーズの作製】

1. 調製したコラーゲン溶液を解凍し、氷中で 10min 超音波をかける。
2. 恒温槽を 37℃にセットする。
3. 2mL のチューブか遠沈管にコーンオイルを分注して、恒温槽にセットする。
4. シリンジに各溶液をセットする。シリンジ内の気泡はなるべく抜く。
*シリンジをシリンジポンプにセットする。コラーゲンのシリンジ上には氷冷する。
5. シリンジポンプの流速セットし、送液を開始する。この時コーンオイルを先に流し、デバイス内の空気を全て出し切ってからコラーゲンをスタートさせる。
6. 液滴の粒径が安定してから（カバーガラスに少量取って顕微鏡で確認）、採取を開始する。
7. あらかじめ分注して温めておいたコーンオイルに droplet を受ける。
8. シリンジポンプを止める時は、先にコラーゲン側を止めてから（droplet が出て来なくなるまでオイルを流す）、コーンオイル側を止める。

【コラーゲンゲルビーズの抽出】

コーンオイル中に採取したコラーゲンビーズは下記の手順で培養液中へ抽出する。

ヘキサデカンへの置換

1. 上清であるコーンオイルを吸引除去する。
2. ヘキサデカンを加える。
3. チューブを転倒攪拌してビーズを分散させる。
4. 静置しビーズが沈降後、上清を捨て、再びヘキサデカンを加えて攪拌する。
5. 再度ビーズが沈降後ビーズを吸引しないように注意しながらヘキサデカンを除く。

培養液への展開

1. DMEM をチューブの壁を伝わらせて、ゆっくりと入れる。ビーズを舞い上げないように慎重に加える。
2. 遠心分離（3000rpm,3min,R.T.）によりビーズを沈降させる。
3. 遠心後、上清を吸引し残存オイルを除去する。

4. 軽くピペッティングしビーズのペレットを浮遊させて、なるべくペレットのみを吸い取る.
 5. 新しく用意した DMEM 入りのチューブにペレットを移し、ビーズをゆるやかにピペッティングする.
 6. 再度 6000rpm,3min,R.T の条件で遠心分離を行う.
 7. 同じ要領で、新しい無血清 DMEM 入りチューブにペレットを移し、遠心分離を行う.
 8. 新しいチューブに無血清 DMEM を 200 μ L 入れ、これに前述と同じ要領でペレットを移す.
 9. カバーガラスに少量取って検鏡する.
- * 出来たビーズを保存する場合は 37°C のインキュベーターに入れて保存する.

(2A)-2-2-3 結果と考察

a. コラーゲンゲルビーズの大量生産

【コラーゲン溶液の検討】

本研究では、コラーゲンゲル溶液として抗原部位が除去されている中性コラーゲン溶液 (2 mg/mL) を使用した. 抗原部位が除去されていないネイティブのコラーゲン溶液は、中性化後、室温ですぐにゲル化してしまうため、本デバイスでの利用は難しかった. 一方で、中性コラーゲン溶液は、室温中ではゲル化せず、37°C で 30 分間ほど処理することでゲル化し、マイクロ流路では扱いやすいため、本コラーゲン溶液を使用した.

【温度管理 (オイル側)】

これまで、オイル中に採取したコラーゲン溶液が固まらない問題があったが、これは、コラーゲン溶液の問題ではなく、プロセスの温度管理に問題があることを発見した. コラーゲン液滴は、短時間であれば、レシチン入りコーンオイル中でその形状を維持できるが、長期 (>1 時間) では、液滴同士の合一が起こる場合があった. そのため、液滴を回収するオイル側を 37°C に設定し、回収した液滴をすぐにゲル化できるセットアップにしたところ、合一する液滴はほとんどみられなくなった.

【温度管理 (コラーゲンゲル)】

シリンジ内のコラーゲン溶液は室温で少しずつゲル化 (線維化) を開始するら

しく、プロセス時間が長くなるにつれて、生成するコラーゲン液滴の大きさが徐々に大きくなる傾向があった。そこで、コラーゲン溶液が入っているシリンジを氷冷することで、プロセス時間経過によるコラーゲン液滴のサイズ増大は解決できた。図①-(2A)-2-2.4 に温度管理を行った初期セットアップを示す。



図①-(2A)-2-2.4 初期セットアップ。温度管理を行うことで安定してコラーゲンゲルビーズを作製できるようになった。

【大量合成】

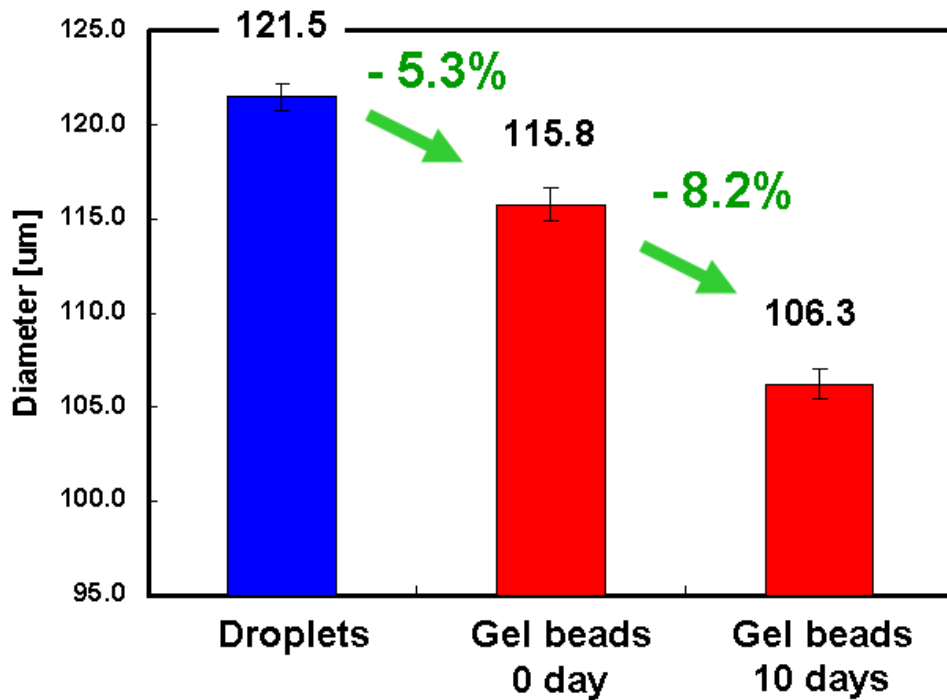
これまで、各シリンジを1つの三次元マイクロ流路デバイスにつないでいたが、三次元マイクロ流路デバイスをさらに3個追加し、並列化することで、これまでの4倍量のコラーゲンゲルビーズを作製できるようになった。図①-(2A)-2-2.5 に並列化セットアップの様子を示す。この場合、生成する量は単純に4倍となるが、各デバイスで粒径は厳密に制御できなかったため、同じ粒径で大量に生産するためには、インレットを1つ、アウトレットを4つの複合型デバイスの作製が必要である。



図①-(2A)-2-2.5 並列化セットアップの様子

【コラーゲンゲルビーズの保存】

作製したコラーゲンゲルビーズは4℃冷蔵庫で保存すると、架橋がほどけてゾル状態に戻ってしまっただ。ビーズを37℃で保存することで、1週間後も、2週間後もビーズの形状を保つことができた。ただし、図①-(2A)-2-2.6に示すように、保存期間が長くなるにつれて、ゲルの顕微鏡下での透過性は低くなり、ゲルの形状が保存10日後では0日後に比べて8%以上縮んでいることから再線維化が進んでいると考えられる。再線維化による細胞接着への影響は顕著にみられなかった。



図①-(2A)-2-2.6 コラーゲンゲルビーズの37℃保存によるサイズへの影響

(2A)-2-2-4 まとめ

【実施項目 1】

カラーゲンビーズの大量生産方法に関する加工条件の検討を行う。

【結果 1】

・プロセスの温度管理を行うことで安定して調製する手法および保存する方法を確立した。また、三次元マイクロ流路デバイスを並列化することで大量に調製できることを示した。

(2A)-2-2-5 発表

a. 論文

1. 津田行子, 森本雄矢, 竹内昌治, ” バイオ材料を扱いやすくするビーズ化技術”, 月刊バイオインダストリー12月号 特集 センシングバイオロジー-生命科学そして医療を支えるセンシング技術-
2. Yukiko Tsuda*, Yuya Morimoto*, Shoji Takeuchi, “Bead-based tissue engineering: moulding cell beads into a 3D tissue architecture”, Nature Materials, (under consideration). *these authors are equally contributed.

b. 学会

1. 津田行子, 森本雄矢, 竹内昌治, ”均一直径細胞ビーズを用いた三次元組織構築” 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月, 広島 (口頭発表)
2. 津田行子, 森本雄矢, 竹内昌治, ”精密組織設計のための細胞ビーズ化技術”, 第9回日本再生医療学会総会, 2010年3月, 広島 (ポスター発表)
3. 津田行子, 森本雄矢, 竹内昌治, ”ビーズで組織を創る”, 細胞を創る研究会 2.0, 10月, 東京 (ポスター発表)

(2A)-2-3 三次元立体構造観察ユニットを用いたヘテロスフェロイドの観察

(2A)-2-3-1 背景と目的

組織や臓器は細胞や細胞外マトリクスなどが三次元的に配列することによって構造的な機能を有している。したがって、再生医療などへの応用を目的に組織・臓器の機能を再構築するためには、個々の細胞が持つ機能だけでなく、その三次元的な構造を検討・評価する必要がある。特に2種類の異なる細胞からなる凝集体（スフェロイド）、すなわち三次元ヘテロスフェロイドの作製においては、その内部で2種類の細胞がどのように存在しているかを観察・評価することが重要である。

立体構造を持つ組織の内部を観察するには主に二つの方法が存在する。一つ目は、物理的にサンプルを薄切してスライドガラスに貼り付け、抗体などで染色を行う方法である。この場合、観察の対象は非常に薄い切片（数ミクロン～十数ミクロン）となるので、通常の光学顕微鏡や蛍光顕微鏡による観察が可能である。一方で、薄切作業に伴い、非常に多くのサンプル処理が必要になる状況が生じることや、薄切時にサンプルが劣化することが問題となる。また、切片作製と観察とは完全に別作業となるため、観察を行いながら切片面の角度を変更する、というようなことは難しい。

二つ目は、サンプルを「光学的」に薄切して観察する方法であり、一般的には共焦点顕微鏡を用いた方法が該当する。ピンホールを用いた観察原理により、レーザー照射により発生した蛍光シグナルを観察面に限定して検出することが出来るため、あたかも組織をスライスしたような観察像を、薄切の作業なしに得ることが出来るのが特徴である。さらに Z 軸方向に連続観察が可能であることから、得られた二次元像を三次元的に再構築して任意の断面像をつくることも可能となっている。共焦点顕微鏡観察は近年では一般的に用いられる観察方法となっているが、レーザーの組織内部への到達距離が 100 ミクロン程度という点、光路全長が励起状態となるため蛍光色素の退色がおこりやすい点が問題となっている。

共焦点顕微鏡が持つ観察の自由度を生かしつつ、その限界点を克服するために「2光子レーザー」を用いた観察方法が開発されている。通常の「1光子レーザー」観察では、1光子だけで蛍光分子を励起するために十分なエネルギーを有したレーザーを用いるが、2光子レーザーシステムでは、光子一つがもつエネルギーが低いので、2光子が同時に蛍光分子に衝突しない限り蛍光分子は励起されない。したがって、励起させたい観察面以外の蛍光分子は確率的にほとんどシグナルを発しないため、余分なシグナルを除くためのピンホールを用いなくてもバッ

クランドを抑制した光学的なスライス像が得られる。また、原理的には光路上の蛍光分子の退色が皆無となる。さらに、検出にピンホールを用いたスキャンングを必要としないので、よりシンプルで感度の高いディテクタ (Non Descanned Detectors; NDD) を利用することも可能となる。2光子レーザーシステムのもう一つの重要な特性として、通常 (488 nm や 543 nm) よりも長い、800 nm 前後の波長域を励起光として使用できることが挙げられる。長波長の電磁波は対象組織のより深部にまで進入できるため、条件によっては表面から 600 ミクロン程度までの深部観察が可能となる。

試験管内で細胞に三次元構造をとらせるための簡便な方法の一つは旋回培養によるスフェロイド形成法である。通常、接着細胞は培養機材に接着させた状態で培養を行うが、ヒトの肝ガン細胞株である Hep G2 などは、細胞を浮遊状態にして旋回させながら培養を行うと、数時間~24 時間程度でスフェロイドを形成する。しかし、マウスの内皮細胞株である MS-1 は 24 時間の旋回培養では凝集体を作らず、細胞は死滅してしまう。したがって、MS-1 のスフェロイド形成や、Hep G2 と MS-1 を用いたヘテロスフェロイド形成には、細胞と細胞とを強制的に結合する「接着剤」が必要となる。本プロジェクトでは、細胞-機材、あるいは細胞-細胞間をほぼ瞬時に接着させることができる接着剤、すなわち「アビジン-ビオチン結合反応」(AB 結合) を利用した研究を行っており、この瞬間接着能力により、MS-1 によるスフェロイド形成、あるいは Hep G2 と MS-1 のヘテロスフェロイド形成を容易に行うことができると考えられる。しかしながら、このようにして作ったスフェロイドの内部構造がどのようになるのかは予想できず、興味深い問題となっている。

本稿では、AB 結合を用いた効率の良い三次元ヘテロスフェロイドの作製方法の確立と、三次元立体構造観察ユニット、すなわち 2光子レーザー発振装置を搭載したレーザー顕微鏡システムを用いた三次元ヘテロスフェロイドの内部構造の観察と評価について報告する。

(2A)-2-3-2 実験方法

a. 三次元立体構造観察ユニット

2光子レーザー顕微鏡はカールツァイス社製の LSM710 にコヒーレント社製のレーザー発振装置を組み合わせたものを用いた。ディテクタは LSM710 に付属している、ピンホールを備えた Descanned Detector に加えて、NDD を新たに設置して使用した。

b. 細胞と細胞培養

細胞はヒト肝ガン細胞株である Hep G2 とマウス血管内皮細胞株である MS-1 を用いた。それぞれ 10% の血清と抗生物質を添加した DMEM 培地で培養を行い、2、3 日置きに細胞を経代した。

c. 細胞のアビジン化とビオチン化ならびに蛍光色素による染色

10 cm ディッシュにサブコンフルエントになった Hep G2 あるいは MS-1 をリン酸緩衝液 (PBS) で一回洗浄して、ビオチン化試薬 (市販の Sulfo-NHS-LC-Biotin を 0.28 mg/ml の濃度 PBS に溶かしたもの) を 2 ml 加え、CO₂ インキュベータで 30 分間反応させた。この操作により細胞表面に存在するたんぱく質のアミノ基にビオチン分子が共有結合した。反応後、PBS で 2 回洗浄し、1 ml のトリプシン-EDTA 溶液で Hep G2 の場合は 7 分、MS-1 の場合は 3 分、CO₂ インキュベータを用いてインキュベーションを行って、細胞をディッシュから剥がした。9 ml の新鮮培地を加えてトリプシン反応を阻害し、40 マイクロメートルのメッシュフィルターを通して凝集した細胞を取り除いた。1,000 rpm、3 分、4°C で遠心を行い、細胞を回収して 2 ml の PBS に懸濁して、これを 1 ml ずつにわけた。一方をビオチン化細胞として培地を 9 ml 加えた後、氷上で保管した。他方は 1.5 mg/ml としたアビジン-PBS 溶液を 2 ml 加え、氷上で 30 分間インキュベートすることで、細胞の表面に存在するビオチンをアビジンで被覆した。その後、7 ml の新鮮培地を加え、ビオチン化細胞とともに遠心を行って細胞を沈降させた。細胞の染色にはシグマの PKH67 (緑色蛍光) と PKH26 (赤色蛍光) を用いた。Diluent C (キット付属の希釈液) 250 マイクロリットルに 2 マイクロリットルの PKH67 あるいは 0.5 マイクロリットルの PKH26 を加え、この溶液を沈降した細胞に直接加えて軽くピペッティングを行った。室温で 5 分間インキュベートした後、新鮮培地を 10 ml 加え、遠心を行って過剰な試薬を取り除いた。再度新鮮培地に懸濁し、一部をトリパンブルー染色して生細胞数を計測した。

ビオチン化、あるいはアビジン化処理を行っていない Hep G2 並びに MS-1 も用意し、ネガティブコントロールとして同様の染色処理を行い、これを用いた。

d. 旋回培養

条件に従って緑あるいは赤の蛍光で染色した細胞を 1.0×10^5 cells ずつ、細胞が接着しないタイプの 6 ウェルプレートに入れ、培地量を 2 ml とした。このプレー

トを CO2 インキュベータの内部に設置したシェーカーで巡回させ、24 時間の培養を行った。

e. スフェロイド数計測

スフェロイド形成作業の後、各ウェルの写真を撮り、目視できるサイズのスフェロイド数を計測した。

f. 観察用プレパラートの作成

スフェロイドを遠沈管に移し、PBS で洗った後、4%パラホルムアルデヒドで 10 分間固定を行った。その後、PBS で洗浄し、微量の PBS とともにスライドグラスにのせ、余分な PBS をキムワイプで除いた。インビトロゲンの退色防止用封入剤を 2 滴垂らし、カバーガラスを注意深く被せてプレパラートとした。

(2A)-2-3-3 結果と考察

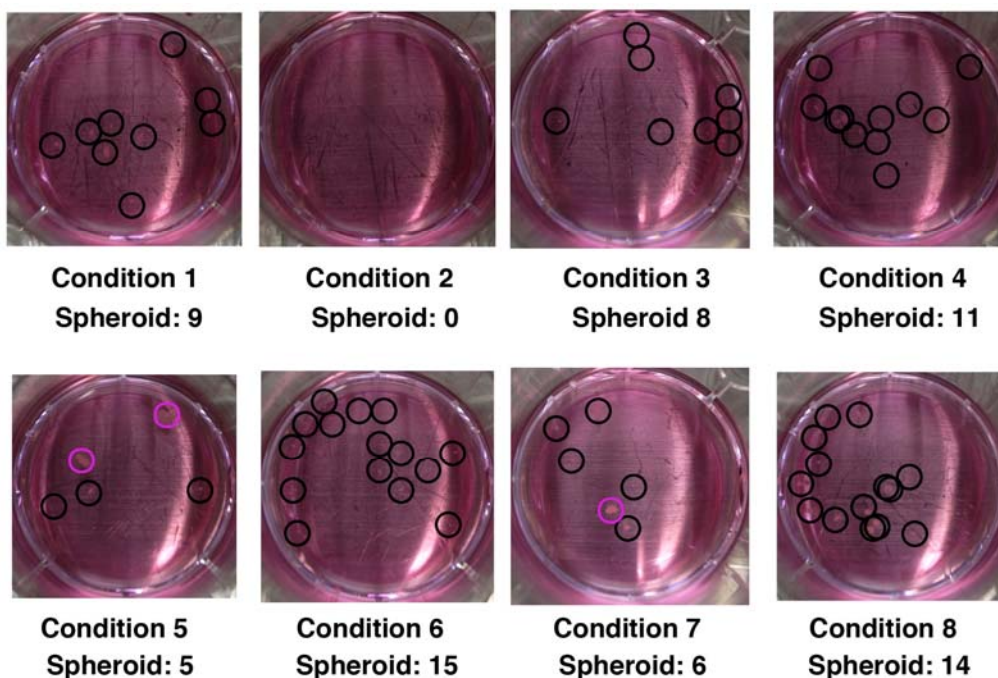
a. 巡回培養によるスフェロイドの形成

アビジン化あるいはビオチン化した Hep G2 および MS-1 を表①-(2A)-2-3.1 の組み合わせにしたがって 6 ウェルプレート（細胞接着処理なし）に入れ、24 時間の巡回培養を行った。図①-(2A)-2-3.1 は各条件でスフェロイドを作ったウェルの写真である。黒い丸印は目視できるスフェロイドであり、マゼンタ色の丸印は特に巨大なスフェロイドを示している。Condition 1、すなわち Hep G2 のみを用いた条件では、AB 結合を用いなくてもスフェロイドが出来ていることがわかった。同じ細胞の組み合わせで AB 結合を用いた Condition 5 ではより巨大なスフェロイドが形成されており、AB 結合による結合力がスフェロイド形成を補助していると考えられた。

Hep G2 は AB 結合がなくてもスフェロイドを作ることが出来るのに対し、MS-1 は何も処理を行わない場合（Condition 2）は一つもスフェロイドができなかった。このような MS-1 であっても AB 結合を利用した際（Condition 6）にはスフェロイドが形成され、AB 結合適用の有効性を強く示す結果を得た。

表①-(2A)-2-3.1 条件ごとの細胞の組み合わせ

Conditions	1	2	3	4	5	6	7	8
緑色細胞	Hep G2	MS-1	Hep G2	MS-1	アビジン化 Hep G2	アビジン化 MS-1	アビジン化 Hep G2	アビジン化 MS-1
赤色細胞	Hep G2	MS-1	MS-1	Hep G2	ビオチン化 Hep G2	ビオチン化 MS-1	ビオチン化 MS-1	ビオチン化 Hep G2



図①-(2A)-2-3.1 旋回培養を 24 時間行った後に生成されたスフェロイドの観察

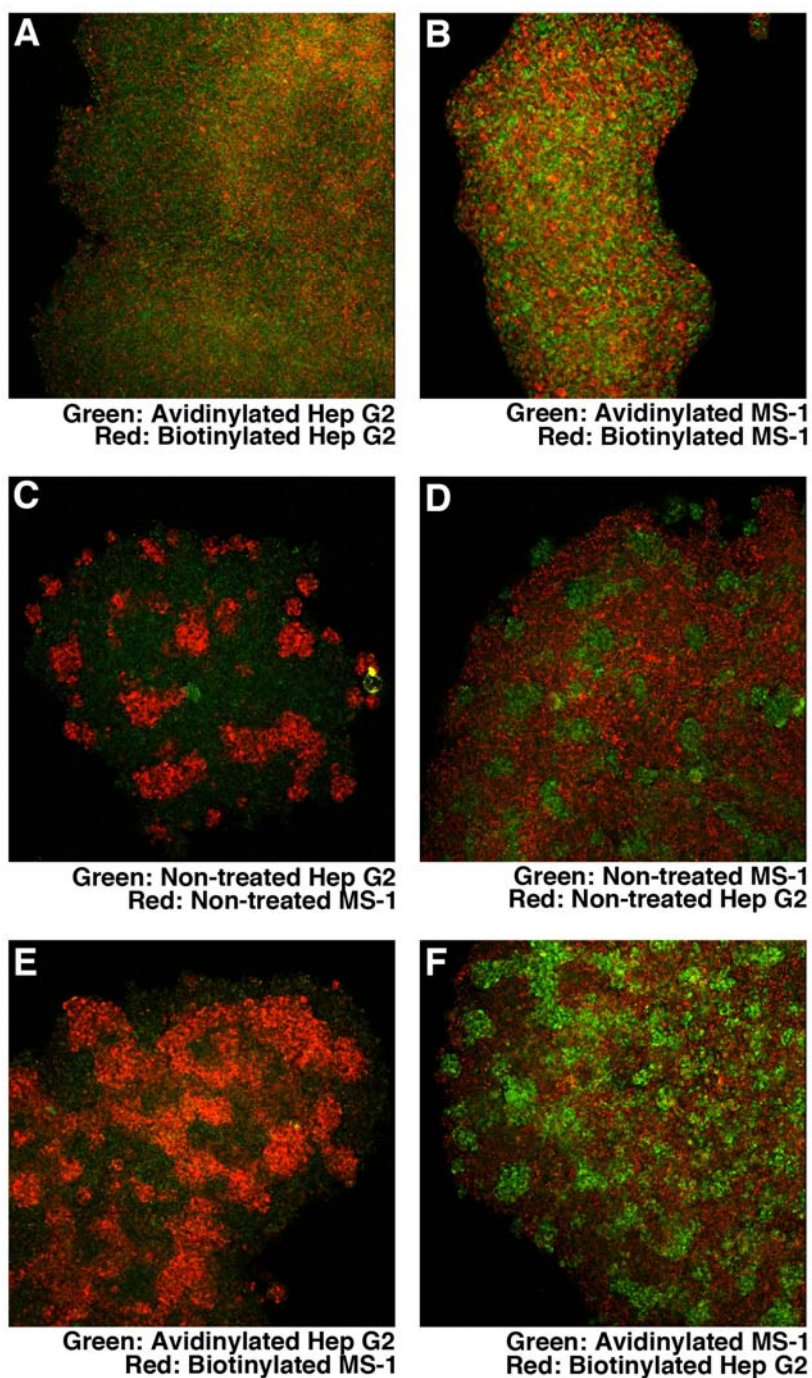
各条件に従って細胞を播種し、24 時間後にウェルの写真を撮影した。黒色の丸印は生成されたスフェロイドひとつひとつを示している。マゼンタ色の丸印は特に巨大なスフェロイドを示している。黒色とマゼンタ色の両方の丸印の数を各写真の下に示した。

Condition 3 と 4 あるいは Condition 7 と 8 は Hep G2 (緑) と MS-1 (赤) あるいは MS-1 (緑) と Hep G2 (赤) を用いて 2 種類の細胞によるスフェロイド作製を目指した実験である。Hep G2 は自発的にスフェロイドを作りやすく、すべての条件に Hep G2 が入っていることから、少なくとも Hep G2 単独からなるスフェロイドが形成されることが予想されるが、本当に Hep G2 単独でスフェロイドが出来ているのか、MS-1 もそのスフェロイド形成に寄与しているのかを明らかにするために、三次元立体構造観察ユニットを用いたスフェロイド内部の観察が必要となった。

b. 三次元立体構造観察ユニットによるスフェロイド内部の構造解析

三次元立体構造観察ユニットの最大の特徴である 2 光子レーザーを用いた観察結果をまとめたものが図①-(2A)-2-3.2 である。図①-(2A)-2-3.2-A は Hep G2 同士を AB 結合により凝集させたものである (Condition 5)。Hep G2 は細胞膜に局在する染色試薬を比較的活発に細胞内に取り込んでしまう傾向があるため、細胞の境界線がわかりにくくなっているが、緑色と赤色がスフェロイド内部において一様に混在していることがわかった。一方、MS-1 同士の結合の場合 (Condition 6) では、MS-1 の細胞膜上に色素が局在しているため、一つ一つの細胞が Hep G2 に比べて判別しやすく、こちらでもやはり異なる色の細胞が均一に混ざっていることがわかった。Hep G2 と MS-1 のスフェロイドを比較すると、特に表面の状態が異なっており、Hep G2 ではラフな、MS-1 では滑らかな表面を持つ傾向があった。

続いて異種細胞を用いたスフェロイドの内部観察を行った。図①-(2A)-2-3.2-C はアビジンやビオチンを導入していない未処理の HepG 2 (緑) と同じく未処理の MS-1 (赤) を旋回培養した結果できあがったスフェロイドの内部である。異種細胞同士は結合しにくいということが一般的に知られているが、ここでは異種細胞同士がスフェロイドを形成していることがわかった。しかし、アビジン化した Hep G2 とビオチン化した MS-1 を用いた際 (図①-(2A)-2-3.2-E) は、MS-1 (赤) の比率が多くなっていることが明確であり、AB 結合によってスフェロイド内部への MS-1 取り込みが効率良く行われるということがわかった。図①-(2A)-2-3.2-C および-E の両方のデータにおいて、赤い MS-1 細胞は同種の細胞で球状あるいはチューブ状にまとまって存在していることがわかった。おそらく旋回培養初期は、図①-(2A)-2-3.2-A や図①-(2A)-2-3.2-B のように 2 種類の細胞が均等に混ざっていると考えられるため、Hep G2 や MS-1 が能動的に細胞移動を行い、このような形態になっていると強く予想された。なお、Hep G2 と ME-1 を染色する色素を入れ替えても同様の結果が得られた (図①-(2A)-2-3.2-D, -F)。

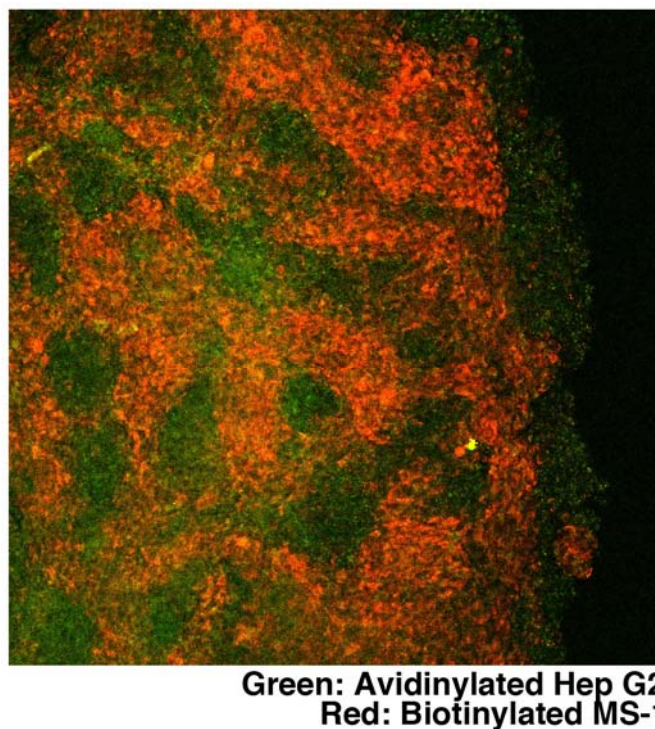


図①-(2A)-2-3.2 二光子レーザー顕微鏡によるスフェロイド内部の観察

緑色、あるいは赤色の蛍光で染色した細胞でスフェロイドを作製してあるため、二種類の細胞を色で特定することができる。A, B, E, F は AB 結合を用いて、C, D は AB 結合を用いずに作成したスフェロイドである。ヘテロスフェロイドは C, D, E, F であり、血管内皮細胞 MS-1 は肝がん細胞 Hep G2 の中で球状、あるいはチューブ状の形状を自発的にとることが分かった。

c. NDDを用いた観察

三次元立体構造観察ユニットの特徴の一つであるNDDを用いて2光子レーザーで励起したシグナルを検出することを試みた。図①-(2A)-2-3.3はCondition 5によって作製されたスフェロイドをNDDを用いて観察したものである。得られた像は内部ディテクタを用いた場合とさほど変わらないように見えるが、超高感度で撮影をおこなっており、微弱なシグナルを検出する際に有効な手段となり得る。



図①-(2A)-2-3.3 NDD を用いた二光子レーザー顕微鏡像

Condition 5 で作製した三次元ヘテロスフェロイドの内部構造を、NDD を用いて検出した。

(2A)-2-3-4 結論

本報告では、AB 結合を用いた三次元ヘテロスフェロイドの作製と、その内部構造の観察を目的として、新規に導入した三次元立体構造観察ユニットを用いた解析を行った。自発的にスフェロイドを形成しないような細胞 (MS-1) でも、AB 結合を用いれば効率良くスフェロイドを作製できること、さらにはヘテロスフェロイド形成においては、片側の細胞を凝集傾向の高いものにするか、あるいは AB 結合を用いることによって、効率良くヘテロスフェロイドを作製できることが示された。このようにして作製した各種スフェロイドは三次元立体構造観察ユニットを用いて観察することによって、バックグラウンドのシグナルを最小限に抑えながら、内部を観察できることが示され、ヘテロスフェロイド内部において、MS-1 細胞は球状、あるいはチューブ状の立体構造をとることが明らかとなった。

(2A)-3 ナノ界面形成およびバイオ高次構造形成分野の最新研究動向調査

ここでは、最新研究動向調査結果として、以下の実施項目について報告する。

【実施項目】 Transducers, μ TAS や MEMS などの国際会議に参加し、同分野の最新動向調査を行う。

(2A)-3-1 Transducers 2009

Transducers 2009(2009年6月21日～25日、米国、コロラド州、デンバー、シェラトンデンバーホテル)に参加し、最新の研究動向調査を行った。以下に学会概要、口頭発表内容、ゲルビーズ、グルコースセンサーをキーワードに持つ発表や、Medical Microsystems に関する発表について報告する。

Transducers 2009 は、マイクロ・ナノテクノロジーをキーワードに持つ最新の研究成果が発表される学会であり、その分野は、機械・光学・化学・バイオ・シュミレーションなど多岐にわたっている。論文投稿数は1307件であり、その内、口頭発表として採択されたのは216件(16.5%)、ポスター発表として採択されたのは、384件(29.4%)であった。

その中で今回、Medical Microsystems のセッションにて、蛍光ゲルビーズに関する研究成果についての口頭発表、及び、最新の研究動向調査を行ったので、ここに報告する。今回から設けられた Outstanding Paper Awards にて表彰された4件の内2件が、この Medical Microsystems のセッションから選ばれ、もともと注目されている分野であると言える。

Life BEANS の柴田、津田、川西、興津、竹内らは、そのセッションにて、「Implantable Fluorescent Hydrogel for Continuous Blood Glucose Monitoring」というタイトルで、蛍光ゲルビーズに関する研究成果を発表した。

J. Chen, M. Chu, K. Koulajian, X.Y. Wu, A. Giacca, and Y. Sun らは「pH-Responsive Drug-Delivery Devices for Implantable Applications」について報告した。pH に応答して膨張収縮する性質を持つゲルビーズを、薬液放出デバイスの薬液放出口として使用した。これにより外部 pH に応じて、薬物を自動的に放出するデバイスを作製することに成功した。また、グルコースオキシターゼとグルコースが反応し、生成されたグルコース酸により pH が変化することで、ゲル径が変わるという成果も発表された。血糖値のセンシングのみならず、自動でインスリンを放出するようなデバイスの研究開発が進んでいくものと考えられる。アイデア自体は新しいものではない。ラットへの埋め込みによる生体適合性についても研究されており、

蛍光ゲルビーズと似た構造である本ゲルの生体適合性評価結果は参考となる。

Y.-H. Lin, C.-M. Chang, and G.-B. Lee らは「A New Platform Manipulating A Single DNA Molecule by Using Optically-Induced Dielectrophoresis」について報告した。光照射により発生する二次元電気泳動(Optically-Induced Dielectrophoresis : ODEP)で、マイクロ粒子を動かすことができる。このマイクロ粒子に DNA 鎖を結合させることで、DNA 鎖を半時計周りに回転させたり、伸ばしたりすることができた。DNA 一分子をここまで、思い通りに動かすことが可能である。DNA の紐としての力学的強度を調べるツールとしても有効であると考えられる。

G.-B. Lee, Y.-H. Lin, W.-Y. Lin, W. Wang, and T.-F. Guo らは「Optically-Induced Dielectrophoresis Using Polymer Materials for Biomedical Applications」について報告した。上で述べた ODEP の発展形であり、光を当てた部分に電界が生じ、粒子をそこから反発させるように移動させることができる。照射する光の強さによって、生じる電界の強さも異なるので、大きさの異なる粒子を簡単に振り分けすることが可能であった。この現象の利用例として、セルフローメーターのように、光の強さで、粒子の大きさを自動的に分離するデバイスが紹介された。また光なのでその形状は、点のみでなく、線状にすることも可能である。これを利用して、光照射による流路の壁により、粒子の流れの方向を制御することが可能であった。新しい流路作製ツールとしての可能性を感じた。

Y.J. Lee, J.D. Kim, and J.Y. Park らは「Flexible Enzyme Free Glucose Micro-Sensor for Continuous Monitoring Applications」について報告した。PET フィルム上に白金電極を構築しサイクリックボルタンメトリーを測定することで、酵素を使用しないグルコースセンサーを開発した。グルコースの濃度に応じて、電流値が可逆的に変化し、測定限界はノイズが大きいものの、グルコース濃度 $25\mu\text{M}$ であった。ただし、サイクリックボルタンメトリーがグルコースに特異的に応答する理由がみられなかったので、他の糖類や生体成分存在下においても、グルコース濃度をモニタリング可能であるかが気になるところであった。

H. Izumi, M. Suzuki, T. Kanzaki, and S. Aoyagi らは「Realistic Imitation of Mosquito's Proboscis -Sharp and Jagged Needle and Their Cooperative Inserting Motion-」について報告した。無痛針の作製を目指して、蚊が痛みなく刺す仕組みを解析し、それを

元に主に 3 つの構造からなるマイクロ針を作製した。蚊が刺す様子をハイスピードカメラにて観察したところ、針は約 3Hz で振動しており、また、針を構成する主な 3 つの部位が規則正しく前後に動きながら、皮膚に侵入していくことが確認された。これを基に、電気化学エッチングにより、3 つの部品からなるマイクロサイズの針を作製した。次に、3 つの部品の動く順番を変えて、針刺しを行い、どの動きが一番抵抗少なく、皮膚に侵入可能であるかを検討した。

参考文献

- 1) Utada, A. S., Fernandez-Nieves, A., Stone, H. A. and Weitz, D. A. : “Dripping to Jetting Transitions in Coflowing Liquid Streams”, *Phys. Rev. Lett.* Vol.99, 094502 (2007).
- 2) .Morimoto, Y., Tan, W. H. and Takeuchi, S. : “Three-Dimensional Axisymmetric Flow-Focusing Device using Stereolithography”, *Biomedical Microdevices* Vol. 11, No. 2, pp.369-377 (2009).

参考：膜タンパクのロボット用センサへの応用について

フェロモンも嗅げるロボット!?

～匂いを検出できる細胞をセンサに持つロボットの登場～



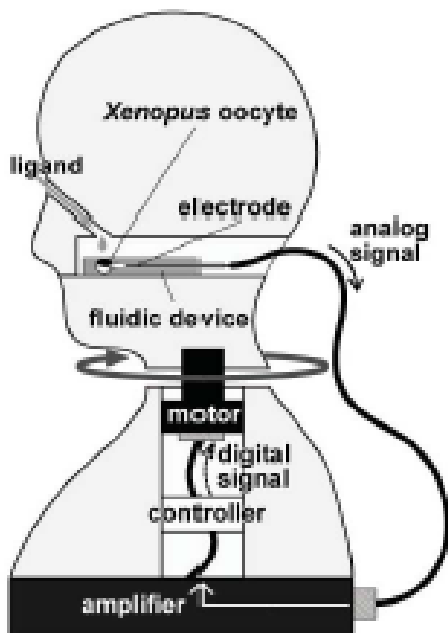
東京大学生産技術研究所
東京大学先端科学技術研究センター
技術研究組合BEANS研究所

竹内昌治、三澤宣雄、光野秀文、神崎亮平

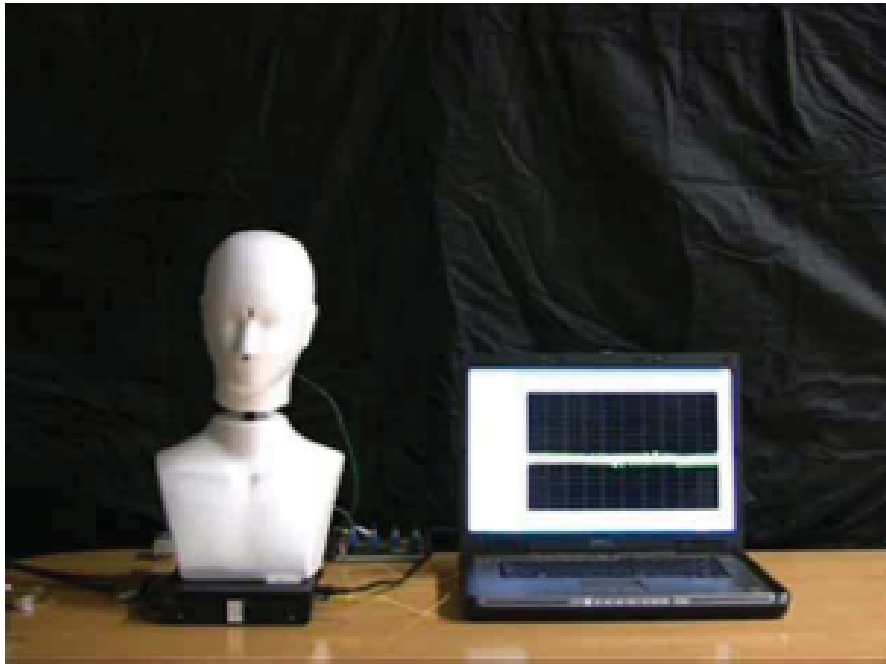




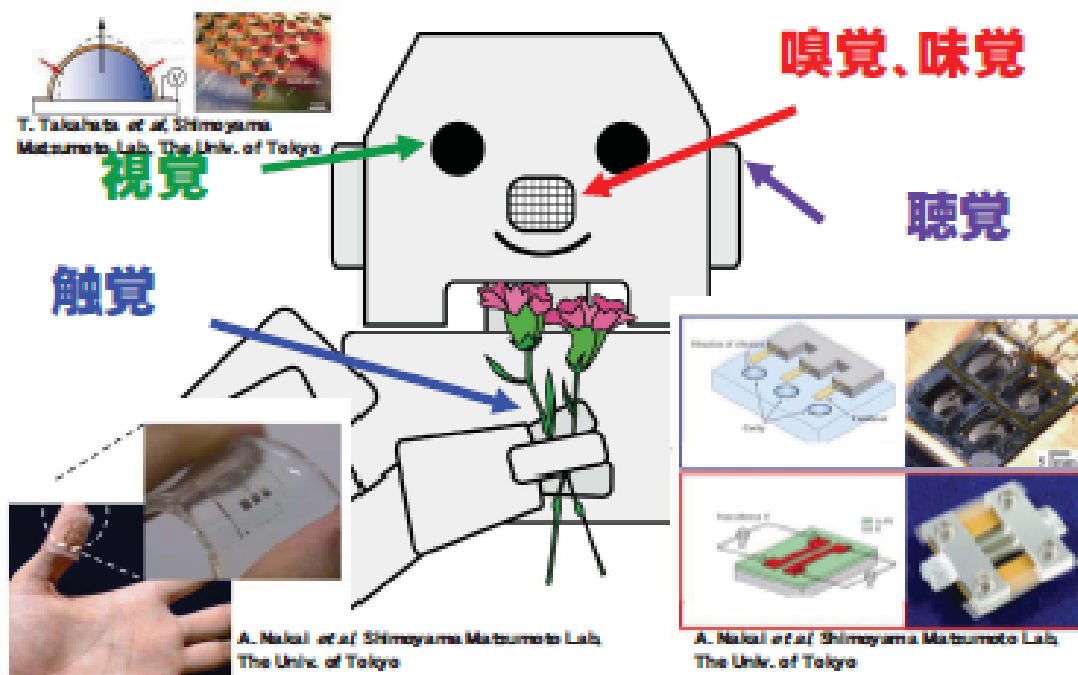
ロボットの中身



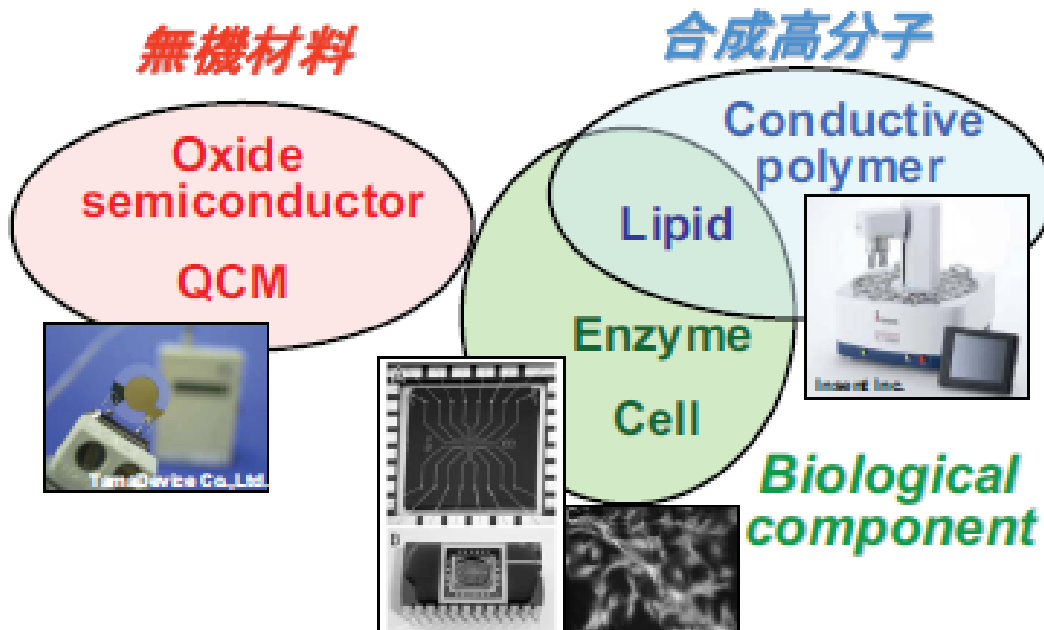
匂いに反応するロボット



ロボットに五感をつける

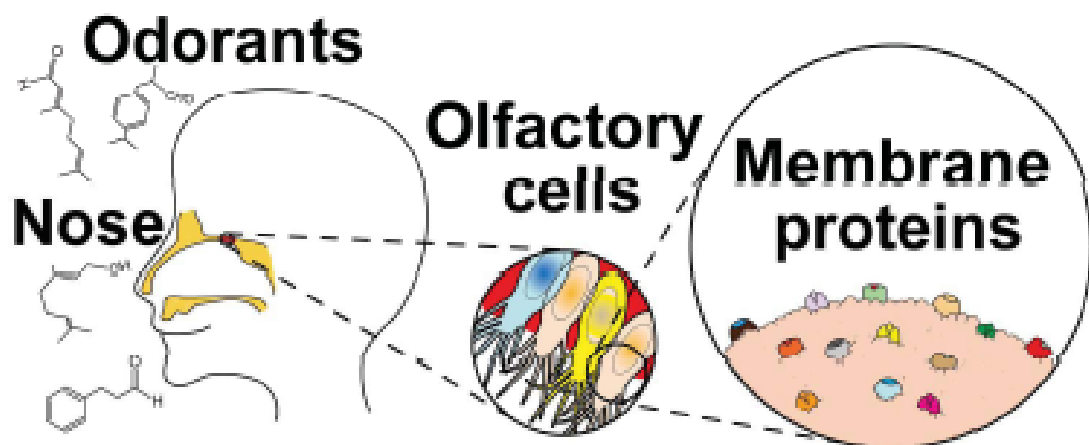


従来の嗅覚センサ

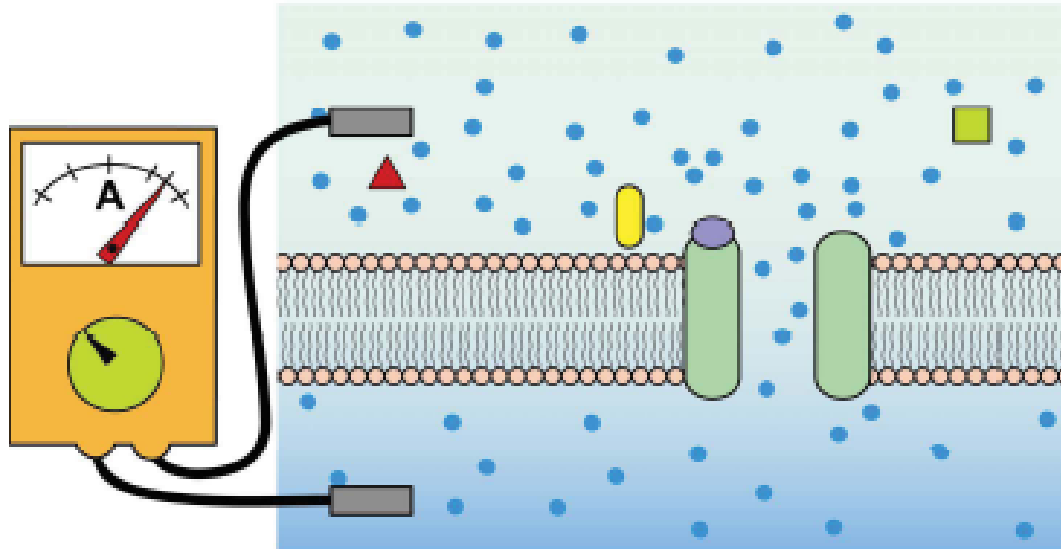


X. Feng et al, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 3230

生物の嗅覚システム(化学量センサ)

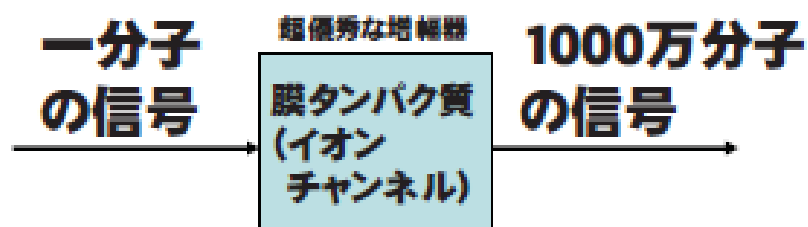


どのように化学物質を認識するのか (膜たんぱく質の仕組み)

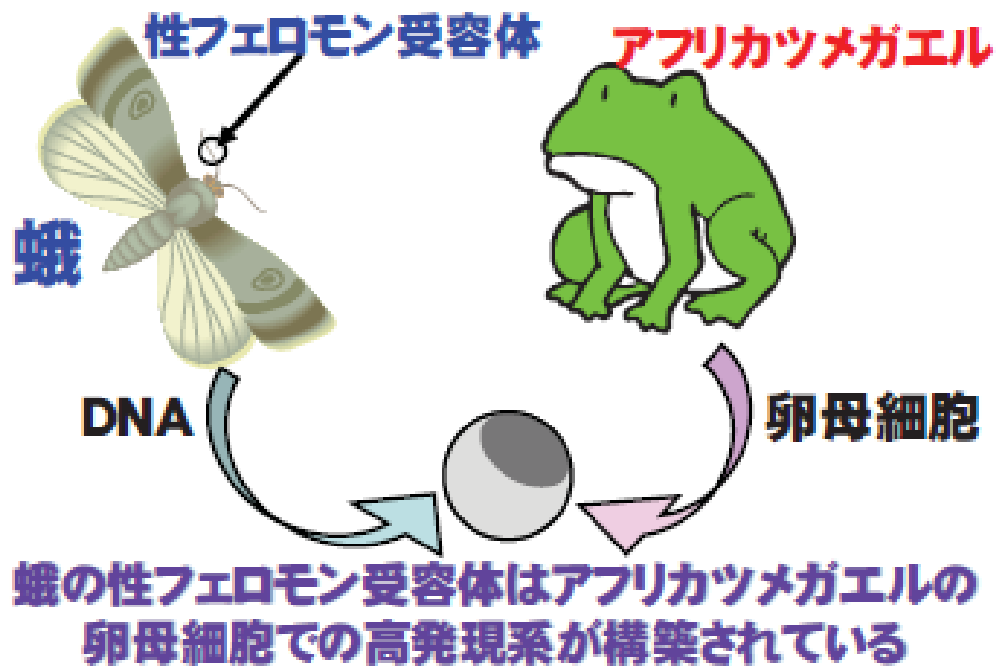


一分子を1000万分子の信号に変換

一分子が検出され、
1秒間イオンチャンネルが開くと、
(100mVの膜電位がかかっていたら)、
およそ1000万個のイオンが通過する。
(数ピコアンペアが流れる)



昆虫のセンサを卵母細胞で発現



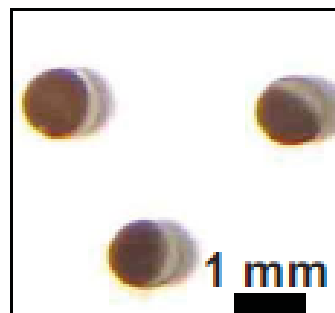
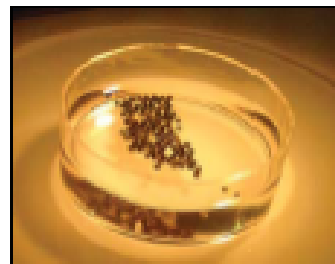
アフリカツメガエルの卵母細胞

Xenopus laevis

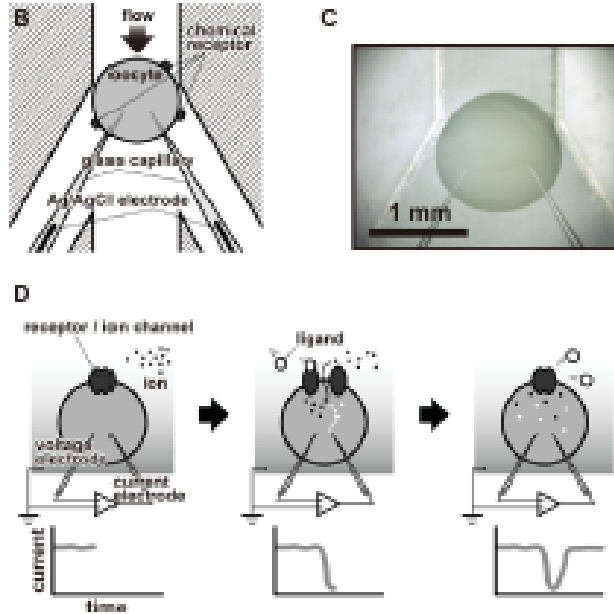
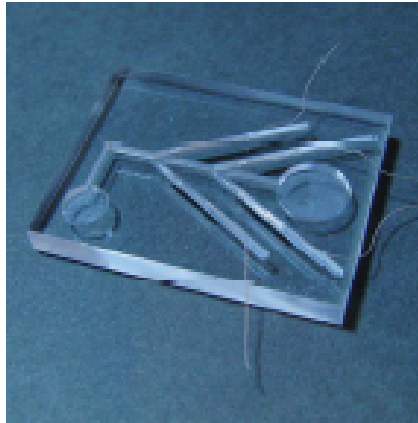


卵母細胞は目的遺伝子のRNAを注入後、数日で目的の受容体を発現し始める。

卵母細胞

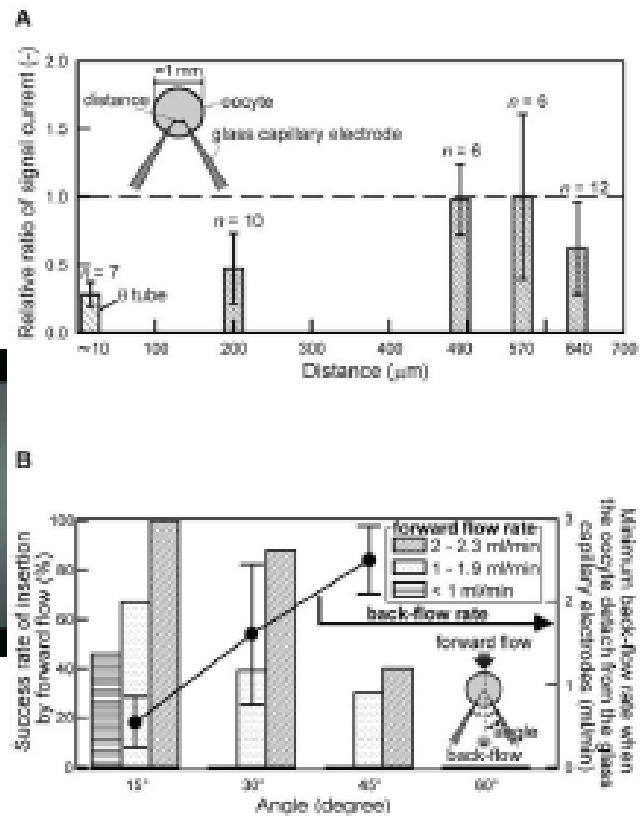
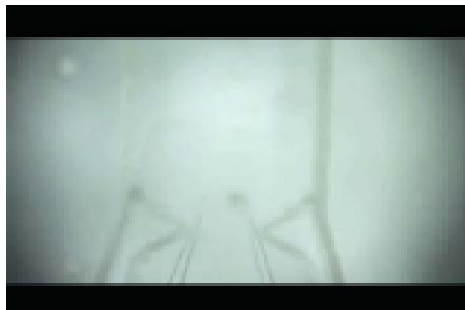


デバイスに組み込み



最適設置条件

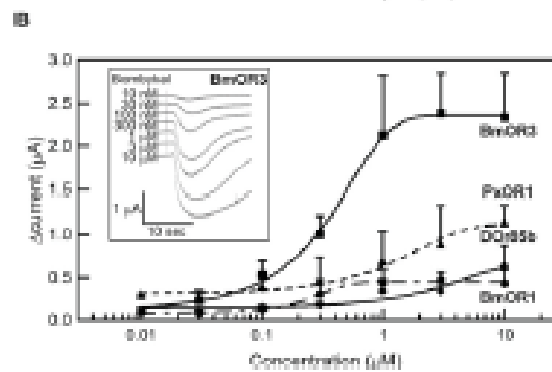
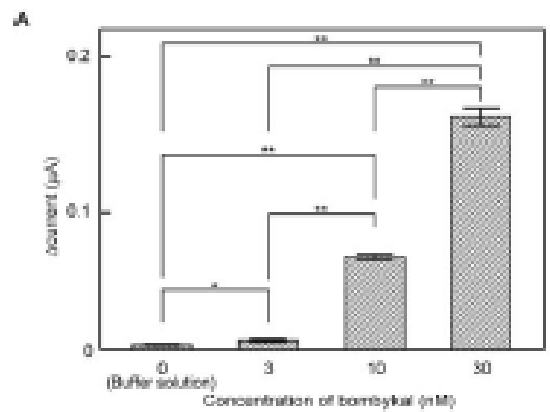
電極間距離、
角度、流速



匂い物質

Receptors	Chemicals
BmOR1	(E,Z)-10,12-hexadecadien-1-ol (Bombykol) pheromone
BmOR3	(E,Z)-10,12-hexadecadienal (Bombykal) pheromone
PxOR1	(Z)-11-hexadecenal (Z11-16:Ald) pheromone
DOr85b	2-heptanone odorant

感 度



世界初のこと

- 匂いセンサとしての細胞をロボットに搭載して機能させた
(細胞導入の最適条件の導出、ノイズ回避)

将来の応用 (膜たんぱく質を利用した生体分子センサ)

- 介護ロボット、口臭、体臭、CO₂?
- 環境モニタリング(大気汚染、水質汚濁)
- 食品センサ