

異分野融合型次世代デバイス製造技術開発プロジェクト

目次

①-A バイオ材料融合プロセス技術の開発.....	V-2
概要	V-2
(1A) バイオ・ナノ界面融合プロセス技術の開発.....	V-9
(1A)-1 脂質二重膜の安定形成プロセスの開発	V-9
(2A) バイオ高次構造形成プロセス技術.....	V-56
(2A)-1 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発.....	V-56
(2A)-2 細胞の立体構造形成プロセスの開発	V-97

①-A バイオ材料融合プロセス技術の開発

概要

【背景】

健康・医療分野で、将来必要とされている次世代デバイスとして、常時健康管理のための体内埋め込みデバイス、超高感度オンサイト予防・診断デバイスなどが挙げられている。

これらのデバイス開発には、高感度、高効率、生体適合などの機能や機構を実現する必要がある。このためには、従来のシリコンを中心とする無機材料に加え、生体分子、細胞、組織、微生物や合成有機分子などのバイオ・有機材料の持つ特異的な機能を活かす融合プロセスの研究開発が不可欠である。具体的には、各種材料の融合の際に、各々の優れた機能を発揮させるため、界面及びナノ間隙における制御プロセス技術が必要である。またデバイスとして機能するためには、バイオ・有機材料を体内などの使用環境において長期間安定させるためのプロセス開発が必要である。さらに、それらを実現するために、同種または異種のバイオ・有機材料を高次構造化させるプロセスの開発が不可欠である。これには、微小器官や細胞の3次元ヘテロ組織化するプロセスなどが含まれる。そこで、本研究開発項目では、上記の背景を踏まえ、ナノ界面融合プロセス技術、及びバイオ・有機高次構造形成プロセス技術を開発に取り組んだ。

【各研究項目の位置づけ】

ここでは、以下の2つの開発テーマを設定し、研究開発を行ってきた。ここでは特に、次世代のバイオ融合 MEMS プロセスには欠かせない、脂質2重膜、ハイドロゲル、細胞を用いたプロセス技術について取り上げた。

(1A) バイオ・ナノ界面融合プロセス技術の開発

(1A)-1 脂質2重膜の安定形成プロセスの開発

(2A) バイオ高次構造形成プロセス技術

(2A)-1 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発

(2A)-2 細胞の立体構造形成プロセスの開発

以下、各開発内容のねらいを項目別に記す。

(1A) バイオ・ナノ界面融合プロセス技術の開発

(1A)-1 脂質 2 重膜の安定形成プロセスの開発

ここでは、バイオ・有機材料特有の生体適合性、特異的分子認識能などの機能を最大限に活用するために、材料の選択的配置、安定化を実現する界面制御プロセスの開発に取り組んだ。たとえば、今後重要になってくる体内埋め込みデバイスや高感度分子センサなどには、生体とデバイスとの間に安定した界面を形成する必要がある。この界面として、ここでは、生体特有の界面である脂質 2 重膜（細胞膜の主体構造）に注目し、この膜をデバイス中に安定して組み込むプロセス技術の開発に取り組んだ。具体的には、脂質 2 重膜をマイクロ流体デバイス技術を利用して形成し、膜中で、膜タンパク質が長期間安定して機能する界面の形成プロセスについて研究した。

(2A) バイオ高次構造形成プロセス技術

ここでは、人工細胞や人工組織など、バイオ・有機材料を構造化することで高度な機能を発現させるために、材料の相互作用を利用した 3 次元構造の組み立プロセス、微小器官・細胞の 3 次元ヘテロ組織化プロセスの研究開発を行った。

(2A)-1 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発

ハイドロゲルは、生体適合材料として注目されている。化学修飾が可能であり、加工性も高い。これらの材料を MEMS として取り込むことによって、長期間の体内埋め込みセンサが実現できると考えている。ここでは、埋め込みセンサのターゲットとして、血糖値モニタリングに注目した。糖尿病の進行を抑える上で大切なのは、血糖値を適切にコントロールすることである。一般に糖尿病患者は血糖値をコントロールするために一日に数回指から採血して血糖値を測定し、血糖値に応じてインスリンなどの血糖降下薬を自分で投与する。しかし、血糖コントロールは長期間継続することになるため、日々の血糖測定と投薬を低侵襲で安全に実施する方法が求められている。そこで、ここでは、完全埋め込み型血糖センサを提案し、低侵襲で安全な血糖センサを目指した糖応答性蛍光ハイドロゲルの研究を進めた。

(2A)-2 細胞の立体構造形成プロセスの開発

創薬において、医薬品候補物質の肝臓での代謝、輸送を予測することは極めて

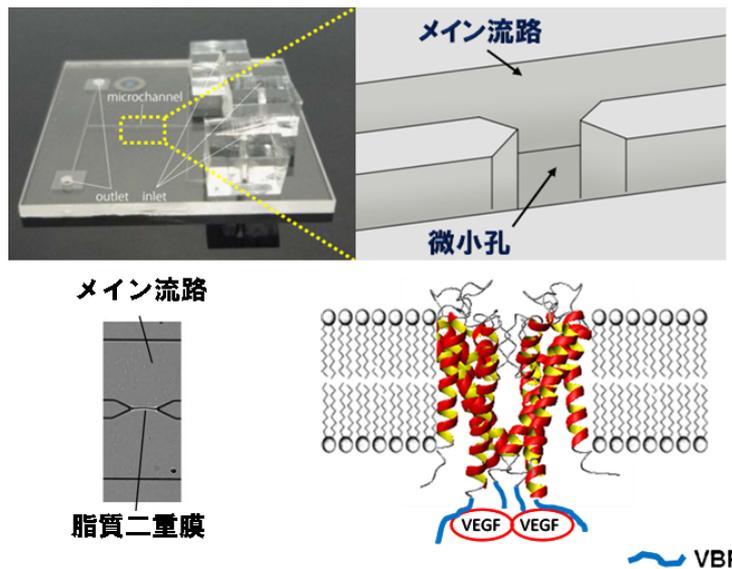
重要である。多くの場合、動物やヒトに対する試験物質の投与による、予測を行うが、このためには多くの時間やコスト、化合物量が必要であるため、実施するのは困難であった。そこで、薬物代謝予測試験に用いることができるような、立体臓器モデルを生体外で構築する研究が注目されている。ここでは、細胞サイズ（10 ミクロン程度）の物体を操作したり組み上げたりすることが得意な MEMS やマイクロ流体デバイス技術を取り入れ、高速に 3 次元の組織形成を行うプロセスについて研究した。たとえばモデル肝臓は、生体肝臓と同様に、極性、すなわち血管側膜と毛細胆管側膜を持つことが必要である。平面培養環境に置かれると直ちに持っていた代謝活性やトランスポータ活性も著しく低下する。本研究開発課題では、肝細胞を用いて、毛細胆管構造を制御して立体的に形成するプロセスを開発し、より正確に生体の肝臓での代謝輸送を予測できるような肝細胞培養系の確立を目指した。

【各研究項目の成果概要】

(1A) バイオ・ナノ界面融合プロセス技術の開発

(1A)-1 脂質 2 重膜の安定形成プロセスの開発

本テーマでは要素研究として最初の 3 年間は、2 時間以上安定して機能する脂質二重膜の形成プロセスの開発を目指した。接触法とマイクロフルイディクス技術を応用したマイクロ流路デバイスを試作し、脂質膜形成を確認した。次に、長期安定形成を目指し、デバイスの材料の最適化（ガラスを使用）や脂質種類、濃度等を検討し、24 時間以上の脂質膜の形成を確認した。更に 2 年間の実証研究では実用化へ向けた取り組みとして、まず、ガラスデバイスの構造を見直し、膜タンパク質の動作を電氣的に測定できるデバイスを開発し、放線菌 *Streptomyces lividans* 由来カリウムイオンチャネル KcsA（野生型）の電流シグナル測定に成功した。また、並行して KcsA の遺伝子を用いて、ガンマーカである血管内皮細胞増殖因子 VEGF と結合するペプチド配列を付加した KcsA 改変体を作製し、大腸菌発現系により発現、精製を行った。また、KcsA 改変体を脂質二重膜リポソームに組み込むことでプロテオリポソームを作成し、SPR 法により VEGF の結合動作を確認した。

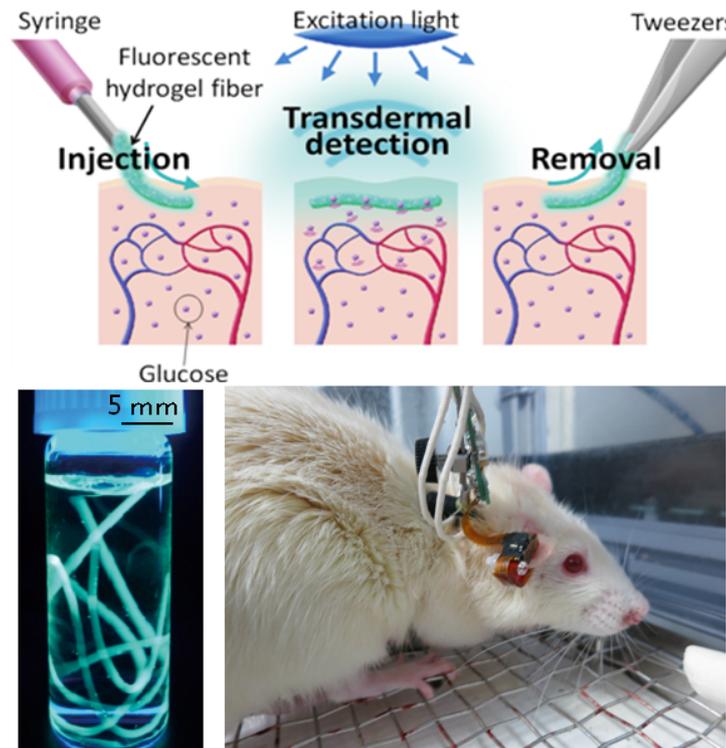


図①-1 脂質 2 重膜の安定形成プロセスの開発：ガラスを加工して作製したマイクロ流路中に脂質 2 重膜を 24 時間以上安定して形成することに成功した。また、脂質 2 重膜にイオンチャネルなどの膜タンパク質を導入し、チャンネル電位を計測できることを示した。

(2A) バイオ高次構造形成プロセス技術

(2A)-1 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発

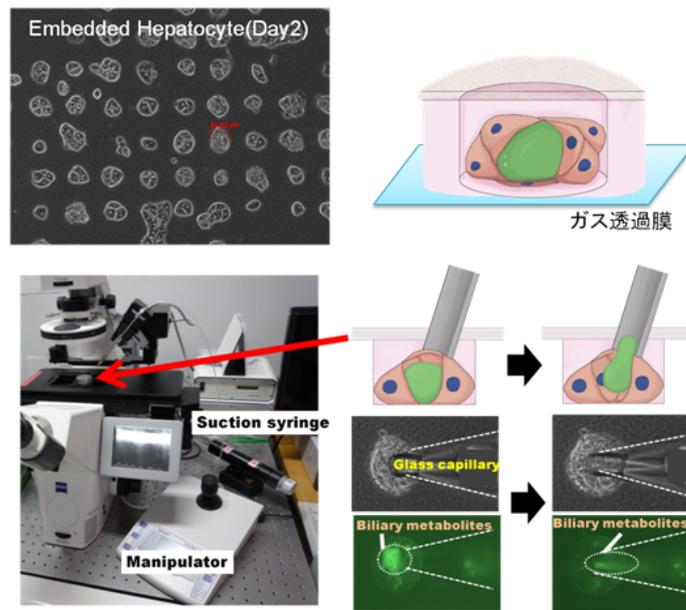
本テーマでは要素研究として最初の 3 年間は、糖応答性蛍光ゲルの長期間埋め込みを実現するため、表面形状・修飾方法の検討と埋込みに適した形状を検討し生体適合性の向上を目指した。ファイバー型の蛍光ゲルを考案し、140 日間の埋め込み及び糖応答能の確認に成功した。その後 2 年間の実証研究では実用化へ向けた取り組みとして、ファイバー型糖応答性蛍光ゲルの血糖測定精度検討や蛍光ゲルの性質調査（劣化速度、濃度反応性等）、連続血糖測定システムの構築を行った。開発した蛍光ゲルファイバーが従来の連続血糖用センサよりも測定精度が高いことがわかった。また、覚醒下の小動物に装着して連続測定が可能な測定装置開発を通じ、安定な測定を可能とする装置構造の考案と測定メカニズムの検討、今後の実用化へ向けた課題についての有用な情報を得られた。



図①-2 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発：血糖値に応じて蛍光強度を変化させるハイドロゲルを微小なファイバー状に加工しマウスの耳に埋め込んだ。耳の外に小型蛍光計測を装着させ、140 日後でもハイドロゲルセンサーが機能し、血糖の変動を検出できることが分かった。

(2A)-2 細胞の立体構造形成プロセスの開発

要素研究で得られた知見により作製された細胞組織が創薬スクリーニングの現場で用いられるデバイスへの組み込み、及びそれを用いた試験サービスを実用化と想定し、「微細組織に化合物添加」、「代謝物抽出」、「分析して生体と同等のデータを取得する」、といった一連の操作ができることを、試験デバイスを作製して実証した。具体的には、要素研究で得た毛細胆管形成制御方法の指針に基づき、ガラス管などの微細管を毛細胆管構造に穿刺するのに最適な細胞配置方法を検討し、胆管構造内代謝物の抽出を実現した。ガラスキャピラリで蛍光胆汁酸などの胆管代謝物を吸引して、定量分析するために、胆管面積、胆汁排出活性を最大にできるような、コラーゲンゲル円型窪みの面積および深さを決定し、配列を最適化した肝細胞集団から胆管代謝物を直接吸引して抽出し、分析できることを実証した。



図①-3 細胞の立体構造形成プロセスの開発：コラーゲンゲルを微細加工して作った微小な容器内で肝細胞を立体培養すると、内部に胆管が形成されることが分かった。この胆管内部に排出された溶液を微小なガラス管を使って回収し、成分分析することで、生体内に近い薬物動態解析を行うことができた。

【今後の展開・期待】

「(1A)-1 脂質二重膜の安定形成プロセスの開発」においては、長時間安定して脂質二重膜を形成が可能で、且つ、電気シグナル計測ができるガラスデバイスの開発に成功した。今後は、デバイス等のハードの面では、更なる歩留まりの向上やマルチアレイ化等の実用化が可能なデバイスや装置にブラッシュアップさせる必要がある。一方、脂質材料等のソフト面においては、センサとして使用する膜タンパク質あるいは解析する膜タンパク質により、デバイス側の脂質二重膜に使用する脂質や膜タンパク質を導入するリポソームを構成する脂質において、適切な脂質を選択する必要がある、それらの組み合わせや検討、実証などを重ね理論やノウハウの確立が必要と考える。

今後の実用化に向けた取り組みとして、まず、KcsA 改変体と VEGF との結合に関する研究開発をさらに進めることをはじめ、多種多様なガンマーカータンパク質に視点を広げることで、ガンマーカーの高感度検出システムの研究開発を行う。これにより、今まで世の中に無い、非常に高精度なガン検知センサデバイスの実現に期待ができる。

「(2A)-1 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発」において開発された糖応答性蛍光ゲルは、従来課題と言われていた連続測定用血糖センサの短寿命を克服し、長期の連続血糖測定を実現できる可能性を持っている。今後はヒトでの実用化へ向けて、簡単に埋め込むための器具開発や気軽に装着できる測定装置開発へと向かうことが考えられる。これらに向けさらに測定精度を向上させるリファレンス物質の導入や、蛍光劣化やノイズの補正アルゴリズム検討などを実施していく。また、生体適合性に関しても、ヒトへ埋め込む場合は高い安全性が要求されるため、ラットよりも大きな動物を使った実験や評価方法の検討が必要になるだろう。

さらにその先として、上記連続血糖測定器を利用した人工膵臓も可能になるだろう。特に人工膵臓では、連続血糖測定の精度と連続測定可能な期間が問題となることが多い。これらの課題を克服できる連続血糖測定器が存在しないため、インスリンポンプとの連動アルゴリズム開発にとって障害となっている。我々の血糖センサは測定精度が高く、長期の埋め込みが可能であるため、これらの課題を解決できる可能性がある。人工膵臓が実現できれば、1型糖尿病のQOL向上に大きく貢献できるだろう。

「(2A)-2 細胞の立体構造形成プロセスの開発」において開発した肝細胞の配列プロセスは、比較的安価で簡単に、そして非常に微細な範囲（直径 50 μ m 前後）への細胞の配列方法を提供する。これと同じレベルの細胞配列を一般的なマイクロ流路や市販の細胞ディスペンサーを用いて行うことは煩雑かつ困難であり、コストも高い。さらに、本プロセスは簡単で迅速性が高いので、扱いやすいが機能性に乏しいような細胞株だけでなく、繊細で生存が難しいが機能性の高い初代肝細胞の細胞配列にも適用することができる。これにより、生体の肝臓の機能に近い状態を維持したままの肝細胞培養を作製することができる。本プロセスによって、肝細胞培養に形状と位置を制御して毛細胆管を形成させることができるようになった。そして、動物実験と同じように、胆管から胆管代謝物を抽出し、その物質の成分や量を分析することができた。これにより、動物やヒトを用いずに、医薬品候補化合物などの体内での代謝や輸送を予測することができる。このようなことを可能にするデバイスの波及効果として、より迅速で低コストでの新薬開発への貢献が考えられる。今後は、細胞配列→薬物添加→代謝物抽出→分析、の流れを迅速・簡便化するため、デバイスやシステムの開発へ発展させていく。これにより、研究者や製薬関連だけでなく、多くの人々の健康・医療に貢献できると考えている。

(1A) バイオ・ナノ界面融合プロセス技術の開発

(1A)-1 脂質二重膜の安定形成プロセスの開発

(1A)-1-1 はじめに

研究の背景として、今後、日本が迎える本格的な高齢化社会における大きな問題の一つとして、医療費の増加があり、厚生労働省の医療費調査の資料によると、平成 23 年度では、その医療費は約 38 兆円であり、その中でも 70 歳以上の高齢者の医療費は約 17 兆円にも上り全体の全体の約 45%にあたる。また、平成 19 年度以降、対前年度比約 3%の伸びとなっている（厚生労働省 平成 23 年度 医療費の動向 MEDIAS より）。このように年々膨張する医療費について、早急にその抑制が社会的に求められている。この解決策として重要視されているのは、日頃からのきめ細やかな健康検診や健康チェックによる病気の予防・対策と、病気を早期に発見して治療や進行を防ぐ早期発見・早期治療であると考えられている。また、別の視点として、近い将来における健康分野での医療の課題は、特に高齢者の慢性的な健康障害に対して、患者の QOL（quality of life：ひとりひとりの人生の質や社会的にみた生活の質）を損ねることなく、高める方向で、診断および治療することが必須であると考えられる。この場合も、やはり、病気の早期発見や早期治療が課題となり、中でも早期の病気の発見が非常に重要になると考えられる。そのため、従来の病気の検査や診断に関する技術や方法を越える、全く新たな診断に役立つ技術の確立やその技術を基にしたデバイス、装置、システムの開発が求められている。例えば、低い濃度であっても超高感度で生体情報や生体物質をセンシングできるセンサを有し、また、生体に対して炎症反応を起こさず、体表に貼り付けられる、または体内に埋め込むことのできるなどの健康状態を常に簡単にモニタリングできるデバイスや装置やシステムなどの開発および具現化が期待されている。このような高性能デバイスや装置等によって病気の早期発見や早期の特定、身体的な負担の少なく、且つ、精度の高い経過観察などが可能となれば、患者の早期回復が見込め、それにより、治療期間の短縮や薬剤投与量の減少につながる。その結果、医療費の抑制に寄与することが十分に期待できる。

現在、体内への埋め込み型センサで組成成分情報を連続計測できるセンサの研究開発が各方面で進んでいる。しかしながら、実用化されているデバイスは、電位を計測する電極や、MEMS 技術を使った温度モニターといった物理センサに限られており、医療や健康の分野で期待される生体内成分をモニターする化学量センサについては十分な性能を発揮するものがない。この原因として、センサの小

型化やセンサの駆動源（バッテリー）等の問題はあるが、一番大きな問題は、体内にセンサを留置させた場合、体内組織の炎症反応によるセンサの劣化や、センサ周囲への被包形成があげられる。これらは生体内成分を特に長期間連続計測する上で、重大且つ代表的な障害であると考えられる。そのため、体内に長時間埋め込む、あるいは留置させるセンサの実現には、体内組織の炎症反応を防ぐことができ、且つ、センサ自体の劣化を防ぐことができるデバイス界面の形成技術および形成プロセスの確立が必須である。

上記のように、次世代の健康・医療・環境分野で必要とされているデバイス開発には、高感度、高効率、生体・環境適合などの機能や機構を実現する製造プロセスが必要である。このため、従来のシリコンやガラスを中心とする無機ドライ材料に加え、合成有機分子や生体分子、細胞、組織、微生物などのバイオ・有機材料の持つ特異的な機能を活かす融合プロセスの研究開発が不可欠である。

そこで、本研究開発項目では、これまで MEMS プロセスで扱うことが困難であった、バイオ材料（細胞などの生体材料）や合成有機材料に注目し、それらをデバイス内において、機能素子として扱えるように加工し、利用する基盤プロセスを確立する。具体的には、バイオ界面長期安定形成プロセスであり、将来の埋め込みデバイスや超高感度分子計測デバイスの研究基盤を創出するために、細胞の最表面にある脂質二重膜をデバイス内において人工的に再現し、また、長期安定して機能させ、生体物質や生体情報等の計測を続けられる界面の形成プロセス技術を開発した。

また、将来的に本研究の応用として、選択的にイオンを通過させることができるイオンチャネルや糖やアミノ酸などの輸送を行うトランスポータ等の膜タンパク質を利用した超高感度一分子センサなどの実現を見据え、脂質二重膜安定形成プロセスの確立と平行し、膜タンパク質等の調整技術の検討と人工膜への組み込みプロセスの開発も実施した。

要素研究での成果を基に、実用化に向け、機能性分子を脂質二重膜に導入したセンサーモジュール（デバイス）を試作し、24 時間以上の生化学的な機能発現を蛍光計測等により実証する。また、将来のアプリケーションとしては、世の中に無い、生体物質を選択的に高感度、一分子レベルでセンシング可能な医療、環境分野用高感度一分子センサや膜タンパク質と薬の候補化合物との結合や阻害調査等を行う創薬スクリーニングデバイスを視野に入れている。本研究における具体的な内容は、デバイス内にて脂質二重膜を形成後、ナノポアタンパク質（ α ヘモリシン）の蛍光計測と電流シグナル計測の実施と、機能性膜タンパク質であるカ

リウムイオンチャネル KcsA の電流シグナル計測を実施した。また、実用化デバイスとして、高感度の癌検知センサの実現を想定し、癌マーカである血管内皮細胞増殖因子 VEGF の結合ペプチド配列を付加した膜タンパク質を新たに作製し、その動作確認を行うことを目標とした。

(1A)-1-2 要素技術の概要

(1A)-1-2-1 脂質二重膜の安定形成プロセス開発

a. 中間目標

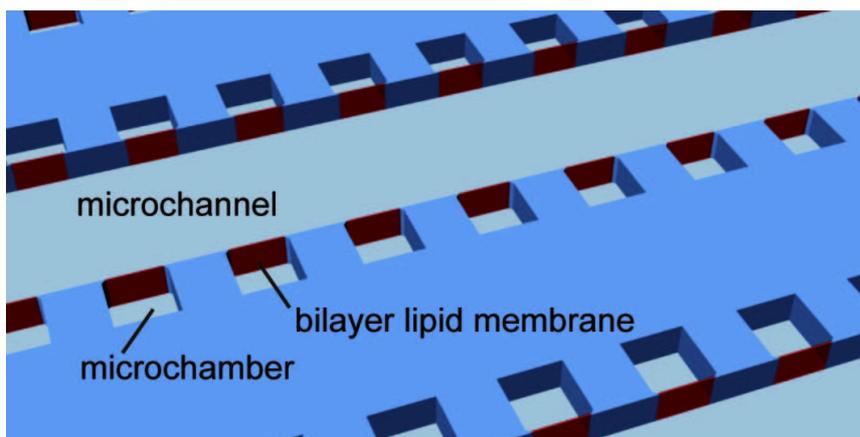
2時間以上安定して機能する脂質二重膜の形成プロセスを開発することを目標とした。

b. 概要

始めに、脂質二重膜の形成法について要約する。本研究で取り組んだ脂質二重膜の形成法は「接触法」と呼ばれる方法である。1) この「接触法」は親水基と疎水基を1つの分子で持つ両親媒性分子である脂質の特性を応用した方法である。

形成方法は、まず、脂質を分散した有機溶媒中に水滴を2つ滴下する。ここで、親水基と疎水基を1つの分子で持つ両親媒性分子の脂質は、有機溶媒中に滴下された各水滴に対して親水基を向ける。これにより、水滴と有機溶媒の界面に1層の脂質層ができる。この状態から、2つの水滴を接近させることにより、各水滴の脂質層同士が近づき、2つの層が接触する（脂質の疎水基同士が接触する）。これにより、水滴の間に、脂質二重膜が形成される。

我々は、この「接触法」に、マイクロ流体技術を融合することで、図①-(1A)-1.1のようなマイクロ流体とアレイ化されたマイクロチャンバーを持つデバイス内でバッファ（水）、油（脂質）、バッファ（水）を連続的に流すことにより、アレイ化されたマイクロチャンバー開口部に脂質二重膜の形成を実現する新しい方法を考案した。²⁾



図①-(1A)-1.1 アレイ化したマイクロチャンバーデバイス図

しかし、研究当初は、デバイス内で形成した膜が脂質二重膜であることの検証がまだ不十分であることや、膜の形成時間が短い（数分ほどの寿命）という課題があった。そこで本項では、20年度から22年度の3か年で、「脂質二重膜の検証」と「脂質二重膜の長時間安定形成の検討」を主眼に置いて研究のまとめを記載する。

c. 実施内容

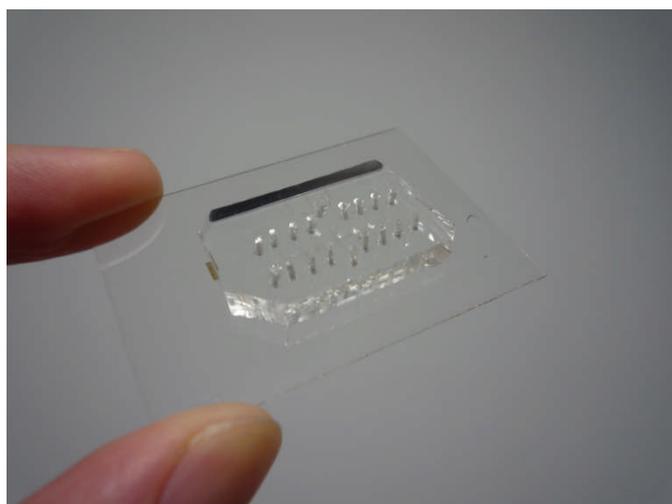
ア. 脂質二重膜の検証

まず始めに、上記方法におけるマイクロ流体デバイス内で形成した膜が脂質二重膜であることの証明を行った。

証明方法は、形成した脂質膜に膜タンパク質を導入し、その膜タンパク質の活性状態を電気化学的に観測することとした。そこで、現状のデバイスに電気の計測機能を付与したデバイスを新たに開発した。

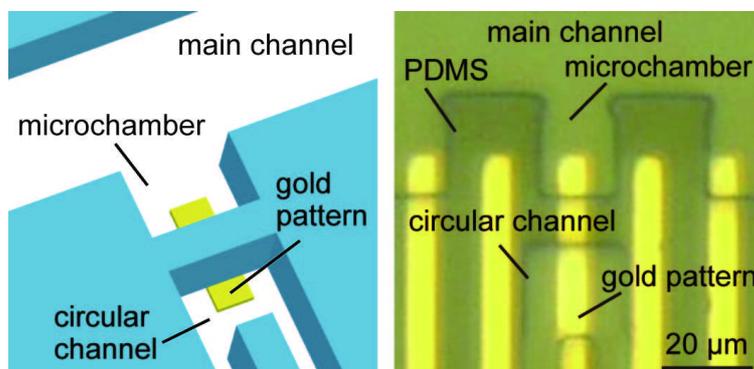
・電気計測機能付きデバイスの開発

今回開発した電気計測機能付デバイスの全体写真を図①-(1A)-1.2 作製したPDMSデバイス写真に示す。デバイスは、PDMSチップとガラス基板で構成されており、PDMSチップ側にマイクロ流路、循環流路、マイクロチャンバーを一般的なソフトリソグラフィ加工により作製した。



図①-(1A)-1.2 作製した PDMS デバイス写真

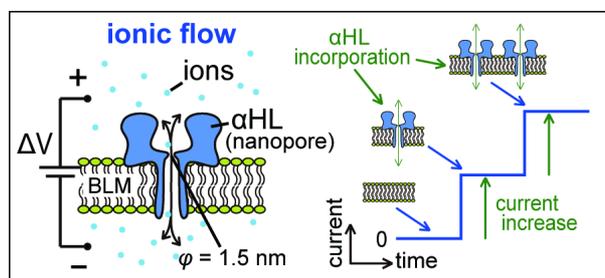
デバイスは PDMS チップとガラス基板を張り合わせた構造であり、PDMS チップにマイクロ流路、マイクロチャンバー、循環流路が構成されており、また、ガラス基板に電極が構成されている。マイクロチャンバーは、マイクロ流路の側面・両側に等間隔で配置し、マイクロ流路側は開口している。また循環流路はチャンバおよび流路には接続されておらず、独立した流路になっている（図①-(1A)-1.3）。一方、電極は、ガラス基板側に金パターンをリフトオフ加工にて形成した。最後に、PDMS チップとガラス基板を接合することによりデバイスが完成した。尚、電気計測は、図①-(1A)-1.3 のように金パターンでマイクロチャンバーと循環流路を電氣的に短絡しており、外部のアンプ装置に接続することにより、電氣的な計測が可能となる。（図①-(1A)-1.3）



図①-(1A)-1.3 マイクロチャンバーと循環流路の接続模式図（左）と顕微鏡写真（右）

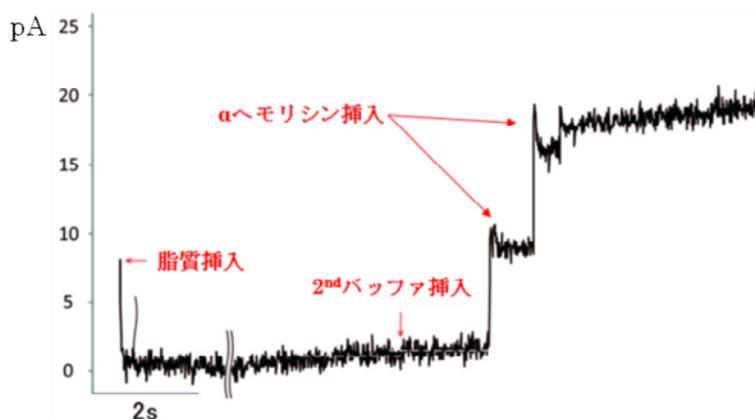
・膜タンパク質のシグナル計測

今回、形成した脂質膜に融合させる膜タンパク質として、膜貫通タンパク質（以下、 α ヘモリシン）を用いた。この α ヘモリシンは分子量約 33kDa の黄色ブドウ球菌から産生される細胞外タンパク質（溶血毒素）である。脂質二重膜が存在すると融合・再構成し、ヘプタマー化して膜に最狭部直径が約 1.5nm の膜貫通型ナノポアを形成する。このナノポアの開口径は常に等しいため、電気計測を行うと導入した α ヘモリシンの数に対応した階段状のシグナルが観測できると予測できる³⁾。(図①-(1A)-1.4)



図①-(1A)-1.4 α ヘモリシン (α HL) による膜貫通孔の電気特性

実際に作製した電気計測機能付きデバイスを用い、 α ヘモリシンの脂質二重膜への挿入を示唆する結果をえることができた。以下に電流計測結果のグラフを示す (図①-(1A)-1.5)。



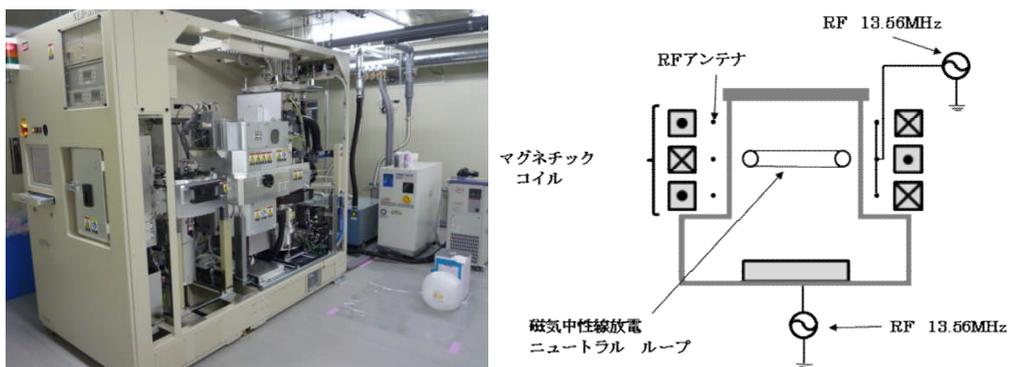
図①-(1A)-1.5 α ヘモリシン (α HL) の電流シグナル計測結果

イ. 脂質二重膜の長時間安定形成の検討

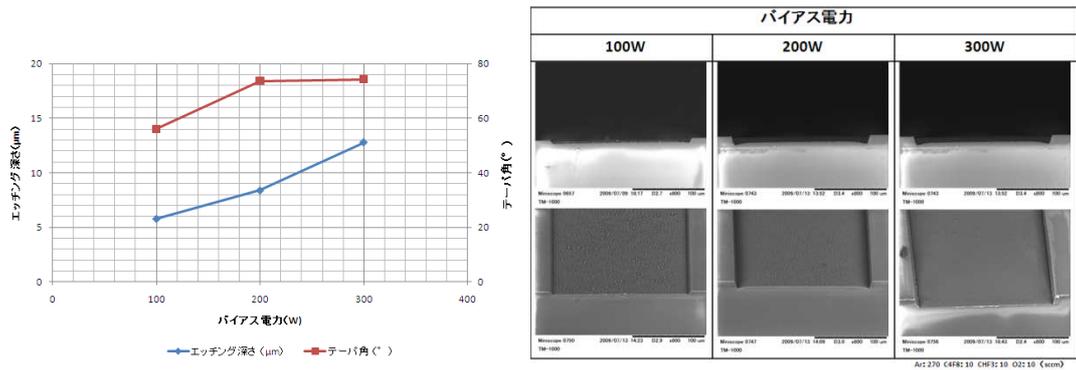
現状の PDMS デバイスは脂質二重膜の形成時間が短いという課題があり、主な原因はデバイスの材料である PDMS が脂質溶媒を吸収することにより脂質二重膜を破壊していると考えられた。そこで、溶媒を吸収しない材料（ガラス）を用いたデバイスを開発し、膜の形成条件である脂質の種類や濃度についての検討とデバイス内流路の表面状態と膜形成について検討を実施した。

・ガラスデバイスの開発

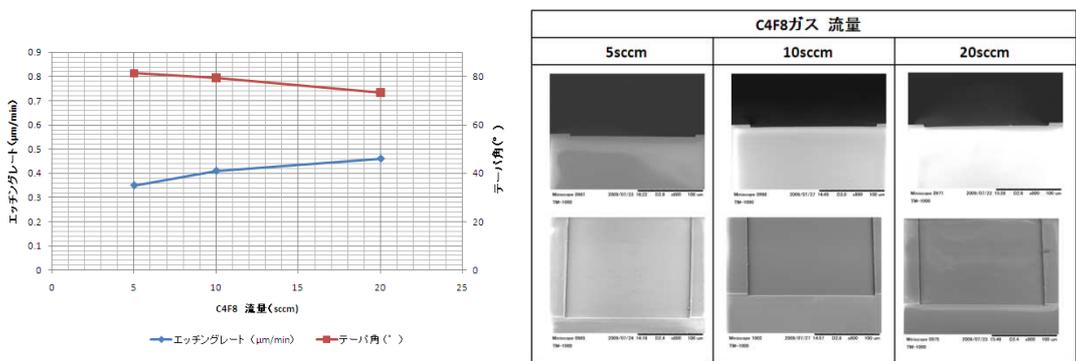
今回、硬質ガラスであるパイレックスガラス（PYREX）をデバイス材料として用いた。ガラスエッチング装置として、低圧で高密度プラズマの生成ができる磁気中性線放電（NLD:Neutral Loop Discharge）プラズマ装置（図①-(1A)-1.6）を使用した。エッチング深さやエッチング表面粗さ等に寄与する主なパラメータであるバイアス電圧とプロセスガス流量の検討を実施し、最適なパラメータの調整を実施した。その結果、バイアス電圧を増加させることにより、エッチング深さおよび、テーパ角の増加傾向が確認できた（図①-(1A)-1.7）。また、プロセスガス（ C_4F_8 ）流量を増加させるとエッチングレートは増加するが、テーパ角は減少することが確認された（図①-(1A)-1.8）。一方、エッチング面の平滑性については、特に変化は見られなかった。以上の検討をした結果、最適なパラメータは図①-(1A)-1.9 に示す最適エッチングパラメータ表で示す値を得た。



図①-(1A)-1.6 NLD プラズマ装置写真と概要図



図①-(1A)-1.7 バイアス電圧可変エッチング結果とエッチング写真



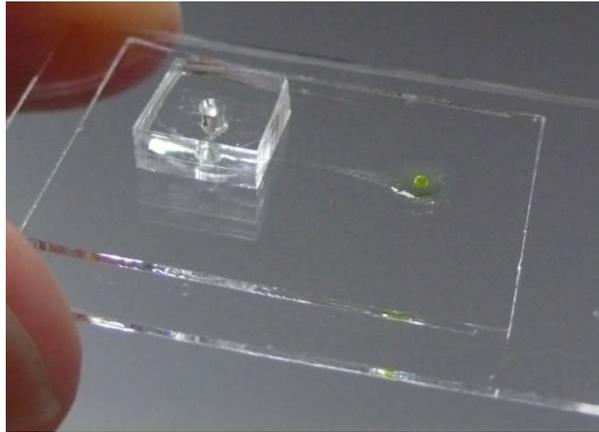
図①-(1A)-1.8 プロセスガス流量可変 エッチング結果とエッチング写真

バイアス電圧	プロセスガス流量 (sccm)			
	C ₄ F ₈	CHF ₃	Ar	O ₂
300W	10	10	270	10

図①-(1A)-1.9 最適エッチングパラメータ表

この最適パラメータを使用し、流路およびチャンバをエッチングしたガラス基板を製作し、エッチング無しのガラスとサーマルボンディング（600℃ベーク×2時間）にて接合した。次に、流路の表面に脂質溶媒がなじむ事を目的として（バッファ（水）により脂質溶媒がすべて流されないように）、HMDS（ヘキサメチルジシラン）を流し加熱処理（80℃以上）することで流路内を疎水化し、デバイスを完成させた。

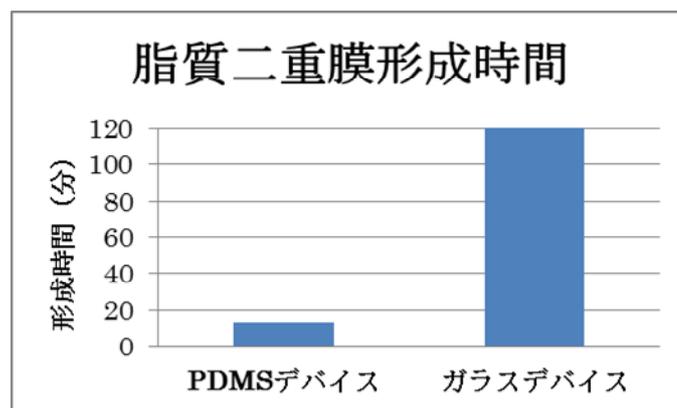
完成したガラスデバイス写真を示す（図①-(1A)-1.10）。



図①-(1A)-1.10 ガラスデバイス写真

・ ガラスデバイスにおける脂質二重膜形成条件の検討と長期形成および検証

開発したガラスデバイスを使用し、脂質二重膜の安定形成を実現する条件の検討および、長時間形成と検証を実施した。まず、デバイス材料の検証を実施した。PDMS デバイスと今回新たに開発したガラスデバイスにおいて、脂質二重膜の形成時間で比較した (図①-(1A)-1.11)。尚、ガラスデバイスおよび PDMS デバイスの使用流体、流体速度を下記に示す (図①-(1A)-1.12)。結果は、デバイス材料を PDMS からガラスに変更することで、膜の形成時間に大幅な改善が見られた。



図①-(1A)-1.11 ガラスデバイスと PDMS デバイスの脂質二重膜形成時間

ガラスデバイス

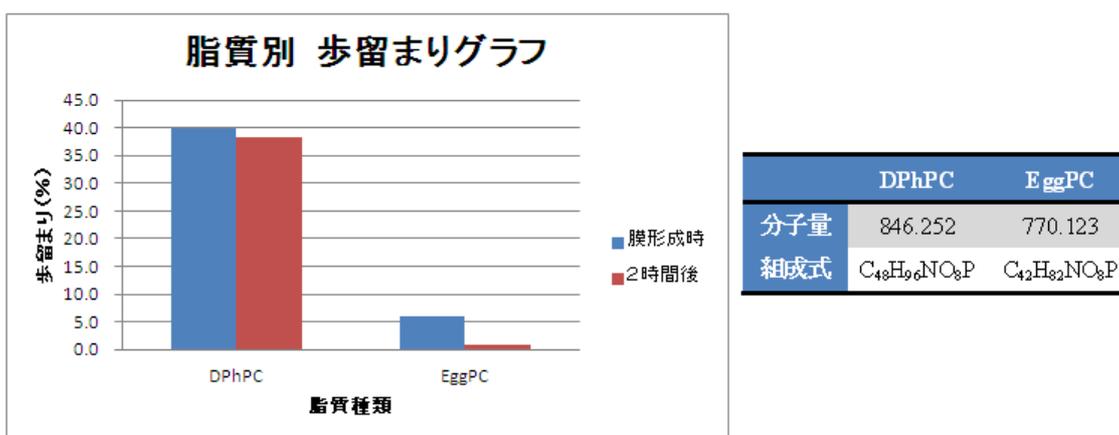
	使用流体	流体速度
1 st バッファ	PBS + Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)	0.7ul/min
脂質	DPhPC + Hexadecane 濃度 10mg/ml	0.3ul/min
2 nd バッファ	PBS	0.15ul/min

PDMS デバイス

	使用流体	流体速度
1 st バッファ	PBS + Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)	1ul/min
脂質	DPhPC + Hexadecane 濃度 10mg/ml	0.8~1ul/min
2 nd バッファ	PBS	0.05~0.1ul/min

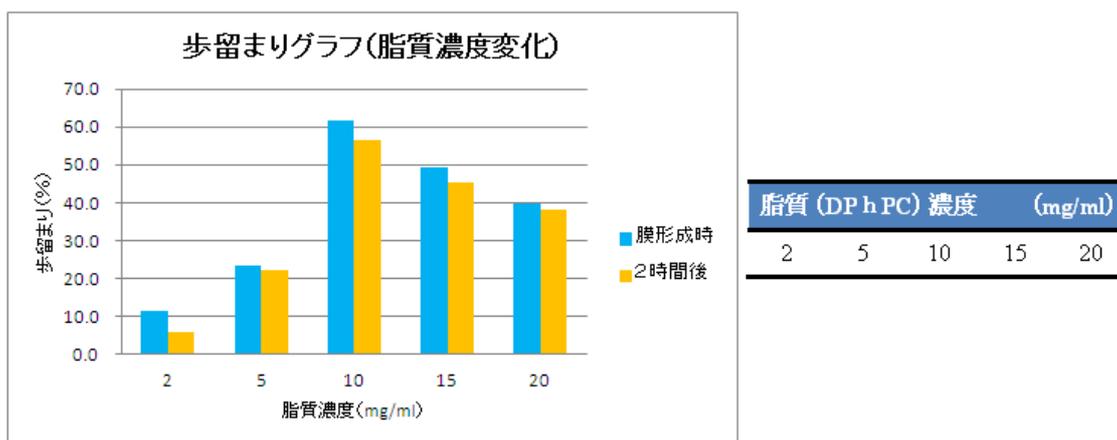
図①-(1A)-1.12 脂質二重膜形成条件表

次に、脂質二重膜の安定形成を実現するため、脂質の種類や濃度、流速の検討を実施した。初めに、脂質の種類として、1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine（以下 DPhPC）と L- α -phosphatidylcholine（以下 EggPC）を膜形成の歩留りの観点で比較し、脂質 DPhPCの方が脂質 EggPCに比べて、膜形成時で約6倍、2時間後で約38倍と大幅に上回る結果となった（図①-(1A)-1.13）。



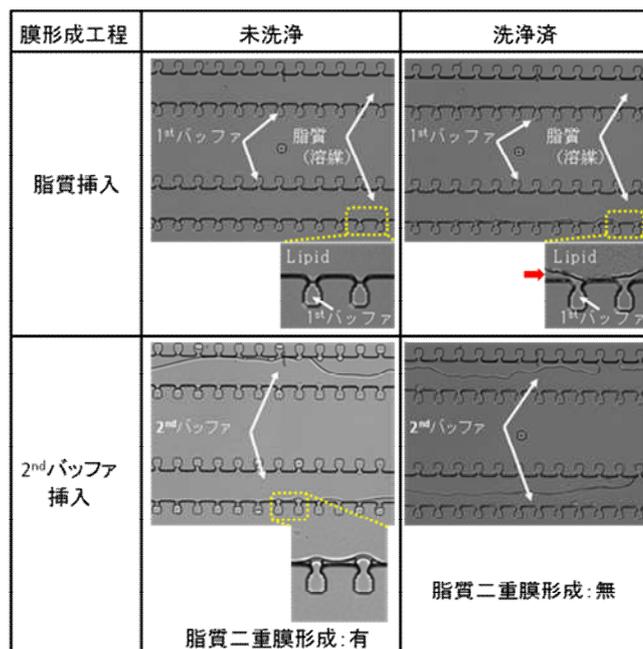
図①-(1A)-1.13 脂質別 歩留りグラフ

次に、脂質種類の検討結果で良好な結果を得られた DPhPC を使用し、脂質の濃度を可変させた時の膜形成時の歩留りで比較した。その結果、脂質濃度 10mg/ml に歩留まりのピークとなった (図①-(1A)-1.14)。

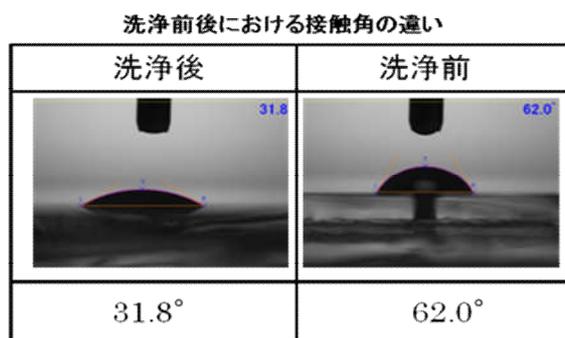


図①-(1A)-1.14 脂質濃度変化別 歩留りグラフ

最後に、デバイス流路の表面状態の検討を行った。ガラスデバイスは有機容易 (エタノール、IPA 等) で洗浄すると再利用できるが、洗浄を重ねると脂質二重膜の形成が次第にできなくなる現象が確認された。そこで、洗浄前と洗浄後 (IPA 超音波洗浄 30 分以上) の脂質膜形成を調査したところ、未洗浄のガラスデバイスにおいては、脂質二重膜の形成が確認できるが、洗浄済のガラスデバイスにおいては、脂質溶媒挿入の際に流路と脂質溶媒との間に乖離が確認され、(図①-(1A)-1.15) その結果、脂質二重膜が形成されなかった。また、脂質溶媒が弾く原因を調査するため、洗浄の前後において接触角を計測したところ、洗浄前が約 60° だったのに対し、洗浄後は約 30° であった。(図①-(1A)-1.16)

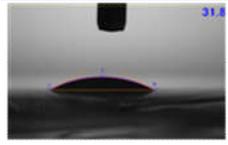
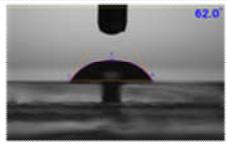
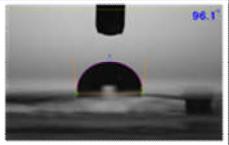


図①-(1A)-1.15 ガラスデバイス洗浄前後 脂質二重膜形成写真



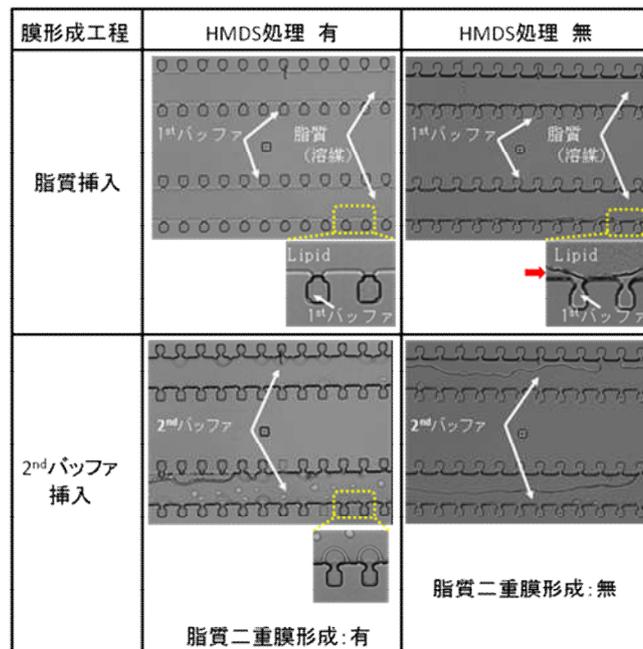
図①-(1A)-1.16 ガラスデバイス洗浄前後 接触角

上記の結果から、液体が接触する表面を疎水化に保つことが安定した脂質二重膜の形成につながると考えられる。そこで、ガラスデバイス内の流路をHMDS（ヘキサメチルジシラザン： $(\text{CH}_3)_3\text{SiNHSi}(\text{CH}_3)_3$ ）を使用し疎水化を実施した。今回のデバイスにおける処理方法と確認は、流路中にHMDSを挿入し、その後、加熱処理（ $80^\circ\text{C} \times 4\text{h}$ ）を加え、接触角計にて計測を実施した。その結果、HMDS処理有の接触角は約 96° で、HMDS処理無し（洗浄前、洗浄後）と比較し値が大きくなっていることを確認した（図①-(1A)-1.17）。

HMDS処理無		HMDS処理有
洗浄後	洗浄前	
		
31.8°	62.0°	96.1°

図①-(1A)-1.17 ガラスデバイス洗浄前後 接触角

次に、疎水化したガラスデバイスを用い、脂質二重膜の形成を試みた。その結果、HMDS 処理有ガラスデバイスにおいて、脂質溶媒が流路側面に弾くことなく、脂質二重膜の形成を確認した（図①-(1A)-1.18）。



図①-(1A)-1.18 ガラスデバイス HMDS 処理 脂質二重膜形成写真

d. 成果のまとめ

(結果)

開発した電気計測機能付デバイスで、ナノポアタンパク質である α ヘモリシンのシグナル計測に成功した。これにより、前記デバイス内における脂質二重膜の形成を確認した。

デバイスの材料を PDMS からガラスに変更することで脂質二重膜の形成時間が増加することを確認した。これにより、デバイスの材料はガラスが望まし

いことが確認できた。

脂質について、2種類（DPhPC、EggPC）を比較した結果、DPhPCの方が高い歩留まりを示した。また、DPhPCの濃度について、濃度10mg/mlにおいて歩留まりのピークを確認した。これにより、脂質の種類や同じ脂質においても濃度により膜形成の安定性が変わる事が確認できた。

ガラスデバイス内の流路の疎水化が安定した脂質二重膜の形成に寄与することを確認した。

(考察)

PDMSは脂質の溶媒であるヘキサデカン（Hexadecane）を吸収する。この現象をデバイスで形成した脂質二重膜に当てはめて考えると、脂質二重膜の両端（PDMS壁面）から溶媒のHexadecaneが吸収され、それにより脂質二重膜が両端から引っ張られるように張力が働き、その結果、脂質二重膜が破れると考えられる。反対にガラスデバイスは溶媒の吸収が無い為、脂質二重膜が安定して維持できると考えられる。よって、デバイスの材料は脂質溶媒の吸収が無いガラスが望ましい。

歩留まりおよび膜の維持率の両方において、DPhPCの方が良好な結果となった。この結果の差は、脂質の分子構造の違いによるものが影響しているのではないかと考えられる。脂質分子の構造は、親水性の頭部と疎水性の尾部で構成されている。ここで、DPhPCとEggPCで違いがあるのが、疎水性の尾部の部分である。DPhPCの疎水性尾部の炭化水素鎖には、メチル基が分岐して付いており、尾部が複雑な形状を取っている。これにより、隣の脂質の尾部同士が絡み易く、そのため膜が形成され易く、且つ、維持され易いと考えられる。

結果から、脂質濃度と歩留まりの関係は、一次関数的でなく、ピークを持つ二次関数的に変化している事から、脂質濃度の最適値が存在することが確認できた。今回の条件下（脂質の種類やデバイスなどの諸条件）では、10mg/mlが最適であったが、脂質が変わると（たとえばEggPC）最適値が変化する事が予測される。

ガラスデバイス内の液体が接触する流路内のHMDS処理を行い疎水化することで、安定した脂質二重膜の形成につながる事が確認できた。これにより、流路表面の状態が脂質二重膜形成に大きな影響を与えており、表面の状態をコントロールすることが重要であることが解った。

(1A)-1-2-2 膜タンパク質の人工膜組み込みプロセスの開発

a. 中間目標

要素研究では、膜タンパク質等の調製技術を検討すること、および膜タンパク質等をデバイスに導入するプロセスの開発を行うことを目標とした。

具体的には、疾患関連マーカータンパク質 VEGF と結合する膜タンパク質 VEGFR をクローニングし、大腸菌によるタンパク質の大量発現系を構築し、発現、精製を行う。VEGFR は主に血管新生に関わるサイトカインである VEGF の受容体であり、細胞内にシグナルを流すことにより血管新生を制御する。VEGFR をデバイスに導入する膜タンパク質に選んだ理由として、①VEGFR のリガンドである VEGF がガンママーカであり、VEGF を検知するデバイス素子を作成することが有用である。②1回膜貫通タンパク質であり、膜タンパク質の中で比較的脂溶性が低い。③VEGFR の VEGF 結合領域のみのタンパク質において精製方法が確立されている点があげられる。さらに、タンパク質をリポソーム膜に組み込み、プロテオリポソームを作製し、表面プラズモン共鳴法 (SPR 法) により当該疾患関連マーカとの結合を確認する。

b. 中間成果のまとめ

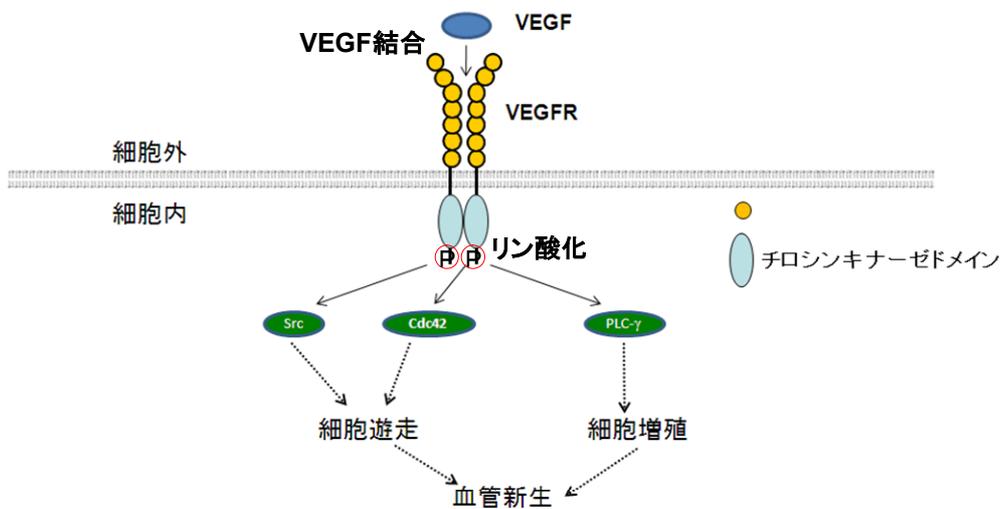
VEGFR は大きく分けて二つの分子機能を有している。一つは VEGF などサイトカインとの結合、もう一つは結合の結果として起こるリン酸化 (キナーゼ) の機能である。VEGF 結合領域は細胞膜の外側、キナーゼは内側に存在する(図①-(1A)-1.19)。

一般的に膜タンパク質は正常に機能を保持したまま発現、精製することが困難であることが知られている。また発現する領域が長くなればその発現精製はより困難になる。そこで今回は、まず VEGF 結合の機能に限定し、VEGF 結合領域と膜貫通領域を有したタンパク質を発現精製し、脂質二重膜に導入することとした。この方法のように膜に導入することが可能であれば、同じように膜貫通領域とタンパク質機能ドメインをつなげることで、本来細胞質で発現するような機能タンパク質も膜デバイスに組み込むことが可能になる (図①-(1A)-1.20)。

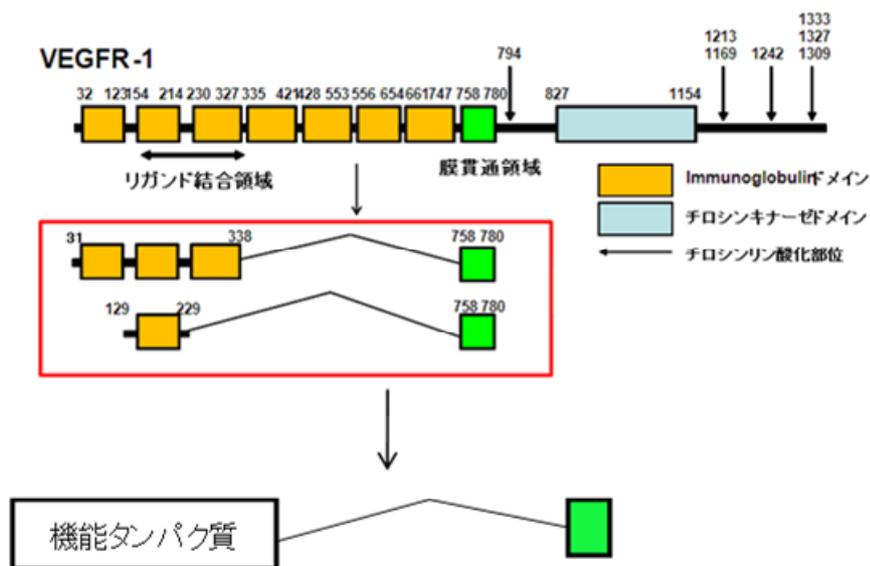
デバイスとして組み込む膜タンパク質として、VEGF に対して VEGFR2 より親和性が高い VEGFR1 に7つあるイムノグロブリンドメインの N 端から1番目-3番目のイムノグロブリンドメイン (31-338) および2番目のイムノグロブ

リンドメイン (129-229) と膜貫通領域予測プログラム SOSUI で膜貫通領域に予測された領域を融合させたタンパク質を設計した (図①-(1A)-1.20)。

VEGF 結合領域 VEGFR1(31-338) + 膜貫通領域 VEGFR1(758-780) (以下 VEGFR1I-TM)、および VEGFR1(129-229)+膜貫通領域 VEGFR1(758-780) (以下 VEGFR1s-TM)をヒスチジンタグ融合タンパク質として発現させる pET16b ベクターに挿入した。さらに、VEGFR1s-TM を融合させたタンパク質をマルトース結合タンパク質 (MBP) と融合させ (MBP- VEGFR1s-TM)、大腸菌発現系を構築し、大腸菌発現および精製を行った。

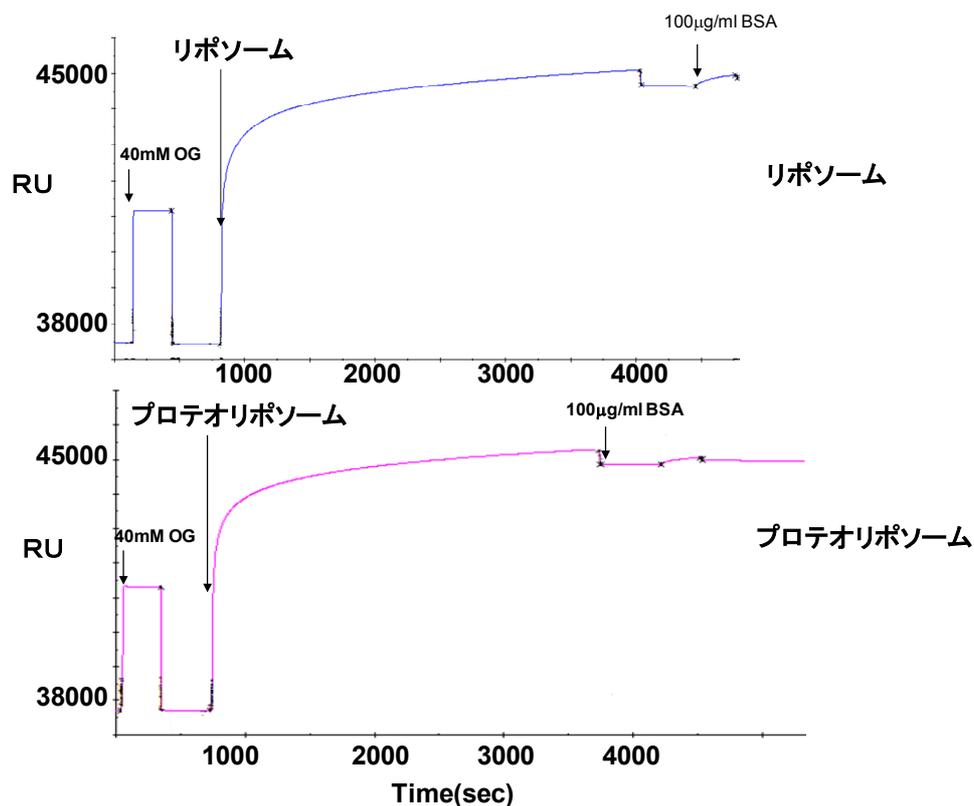


図①-(1A)-1.19 VEGFR の分子機能

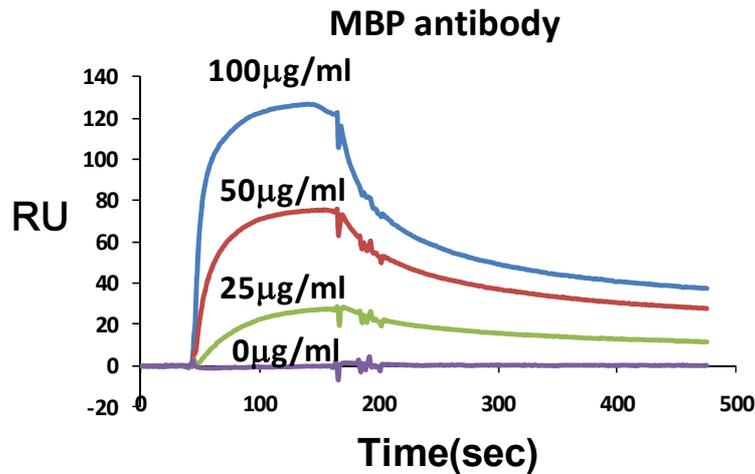


図①-(1A)-1.20 実際に発現させた領域

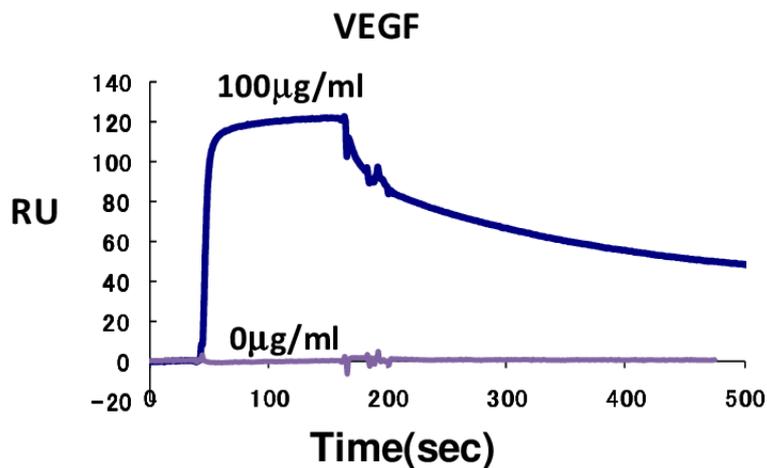
精製した MBP-VEGFR1s-TM と VEGF との結合を調べるために、SPR 法を用いた測定を行った (Biacore T100、GE ヘルスケア)。まず、リポソームおよび MBP-VEGFR1s-TM を組み込んだプロテオリポソームを調製し、Series S Sensor Chip L1 に固定化を行った。その結果、それぞれ約 7000 RU 固定化することができた(図①-(1A)-1.21)。この固定化量は L1 チップの表面がリポソームによる脂質二重膜に覆われるのに十分な固定化量である。次に、MBP 抗体とプロテオリポソームとの相互作用測定を行った(図①-(1A)-1.22)。その結果、予備的な結果ではあるが濃度依存的な相互作用が確認できた。このことから MBP-VEGFR1s-TM は実際にリポソームに組み込まれていることが確認できた。さらに、VEGF と MBP-VEGFR1s-TM との相互作用測定を行った結果、両者が相互作用する結果を得ることができた(図①-(1A)-1.23)。



図①-(1A)-1.21 リポソームおよびプロテオリポソームの固定化



図①-(1A)-1.22 MBP 抗体とプロテオリポソームの相互作用



図①-(1A)-1.23 VEGF とプロテオリポソームの相互作用

以上より、疾患関連マーカーである血管内皮細胞増殖因子 VEGF と結合する受容体タンパク質 VEGFR をクローニングし、VEGF 結合領域である VEGFR1(129-229)および膜貫通領域(758-780)を融合させたタンパク質の大量発現系を構築した。このタンパク質を MBP 融合タンパク質として大腸菌で大量発現させ、精製を行った。さらに、この膜タンパク質をリポソーム膜に挿入することによってプロテオリポソームを作成し、MBP 抗体および VEGF について SPR 法によりその結合を調べ、その結合を確認した。

本結果は、中間目標である要素研究を達成する技術レベルにあり、続いて実証/基盤技術研究を行うに至った。

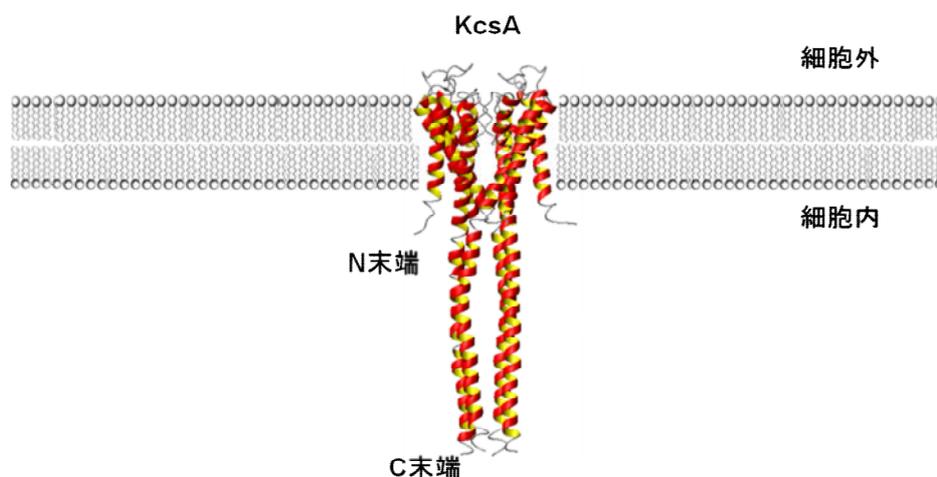
(1A)-1-3 実証/基盤技術研究

(1A)-1-3-1 最終目標

実証研究では、機能性分子を脂質二重膜に導入したセンシングモジュールを試作し、24 時間以上の生化学的な機能発現を蛍光計測等により実証すること、並びに VEGF と結合する膜タンパク質の精製と動作確認を実施することを目標とした。

(1A)-1-3-2 概要

要素研究 (H20-H22) において、脂質二重膜形成プロセス技術開発においては、長期安定した脂質二重膜の形成を目的とし、ガラスデバイスの開発と安定形成を実現する条件検討を実施した。また、膜タンパク質の人工膜組み込みプロセスの開発においては、一回膜貫通膜タンパク質である MBP-VEGFR1-TM を作製し、血管内皮細胞増殖因子 VEGF との結合評価を行った。実証/基板技術研究 (H23-H24) では、最初に、要素研究 (H20-H22) で開発したガラスデバイスにより、脂質二重膜の長期形成について、蛍光分子であるカルセインとナノポアタンパク質である α ヘモリシンを用いて 24 時間以上の脂質二重膜の維持を蛍光測定にて確認した。さらに、膜タンパク質の解析ツール等の実用化を視野に入れ、より難易度が高い、機能性分子 (α ヘモリシン) の電気的なシグナルの計測を目標として取り組んだ。そこで、膜タンパク質の動作を電氣的に測定できるデバイスに改良し、ナノポアタンパク質である α ヘモリシンの電流計測を実施した。次に、膜タンパク質の脂質二重膜への融合と電流測定を実施する。さらに、VEGF 結合ペプチド配列を付加した膜タンパク質を新たに作製し、その動作確認を行うことを目標とした。デバイスに導入する膜タンパク質には様々な種類が存在し、代表的な分類の一つにイオンチャネルがある。また、導入する膜タンパク質は安定であることが不可欠である。そこで、イオンチャネルでありながら、極めて安定である放線菌 *Streptomyces lividans* 由来カリウムイオンチャネル KcsA を選定し、大腸菌発現系により発現、および精製を行った。KcsA は全長 160 残基で 4 量体を形成し、N 末端および C 末端は細胞内にある (図①-(1A)-1.24)。細胞内の pH が低下するとチャネルが開くことが知られている。

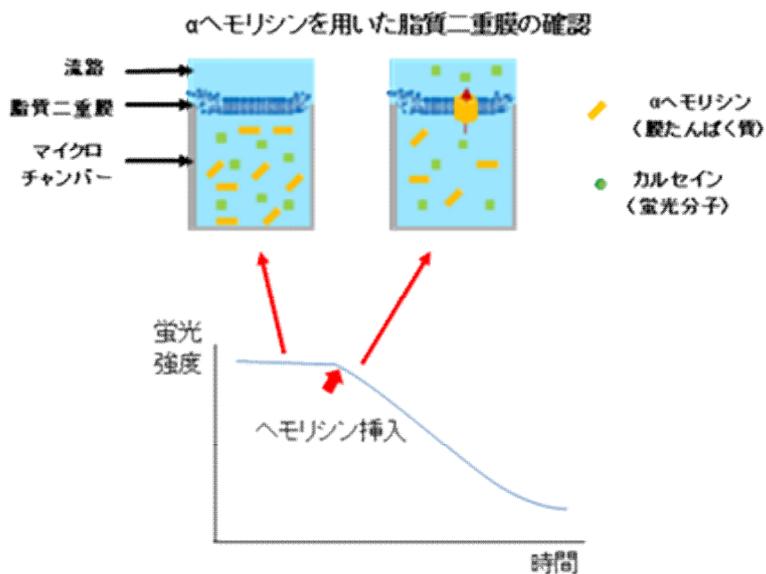


図①-(1A)-1.24 KcsA の構造 (Protein Data Bank コード 1F6G)

(1A)-1-3-3 実験方法

α. 脂質二重膜の 24 時間以上の形成と機能性分子の機能発現の確認

要素研究 (H20-H22) では、デバイスの材料にガラスを用いたことで、長時間安定して脂質二重膜を形成できるガラスデバイスを開発した。本研究では、そのデバイスを用い、蛍光分子であるカルセインとナノポアタンパク質である α ヘモリシンを用い、カルセインが α ヘモリシンのナノポアを通過する現象を 24 時間以上、蛍光強度の変化として測定することにより確認した。 α ヘモリシンが脂質二重膜に構成されると、脂質二重膜でシールされていたチャンバに α ヘモリシンのナノポアが形成され、そこからカルセインが通過するため、チャンバ内の蛍光強度が急激に低下すると予測される。実験は以下の要領で実施した。まず、1st バッファ中に α ヘモリシンと蛍光分子であるカルセイン (Calcein) を混入し、マイクロシリンジおよびマイクロシリンジポンプを用いて、流体 (1st バッファ、脂質、2nd バッファ) を連続的に流し脂質二重膜を形成する。膜形成後、蛍光観察を行う。形成した脂質二重膜に α ヘモリシンが融合すると膜にナノポアが形成され、カルセインがナノポアを通り、チャンバ内から流路側に抜けていき (図①-(1A)-1.25)、カルセインの蛍光強度の変化が確認できる。また、 α ヘモリシンの有無による確認も行った。



使用した流体および流速は以下の通りである。

・使用流体

1st バッファ :

αヘモリシン混合有

PBS + Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)

αヘモリシン (1ug/ml)

αヘモリシン混合無

PBS + Calcein (1.5mM), KCl (15mM), MOPS (0.3mM)

脂質 :

1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)

+ヘキサデカン (脂質濃度 : 15mg/ml)

2nd バッファ :

PBS

・流体流速

1st バッファ : 0.7ul/min

脂質 : 0.3ul/min

2nd バッファ : 0.15ul/min

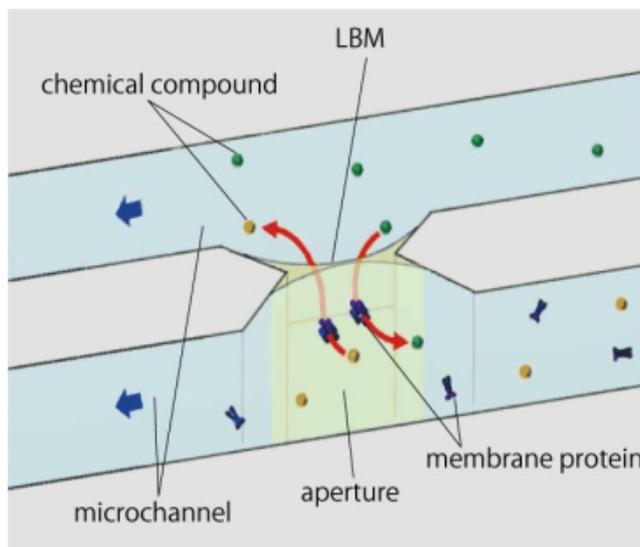
b. 電流計測型ガラスデバイスの開発とナノポアタンパク質の電流計測

要素研究 (H20-H22) では、デバイスの材料にガラスを用いたことで、長時

間安定して脂質二重膜を形成できるガラスデバイスを開発した。本研究では、ガラスデバイスをさらに発展させ、電流計測ができるようにデバイスの構造から見直しを行った。デバイスの実用化を見据えると、膜タンパク質の解析には、膜タンパク質に対し、環境の変化（例えば溶液の濃度）や分子の供給（例えばリガンド）等が自由度高く可変や調整ができる必要がある。さらに、膜タンパク質は方向性を持っており、前述の環境の変化や分子の供給を膜タンパク質に対し、任意の方向で可変や調整ができることが望ましい。しかし、デバイス内において、膜タンパク質の導入の方向性を制御することは非常に困難である。現状のデバイスでは、脂質二重膜の片側のみが流路となっている構造のため、膜に導入した膜タンパク質に対し、環境の変化や分子の供給などの操作方向が流路側に限定される。また、電気的な計測を実施するには、流路とチャンバに電極を持つ構造とする必要があり、デバイス構造が複雑化し、製作の難易度が高くなる。

・デバイス構造

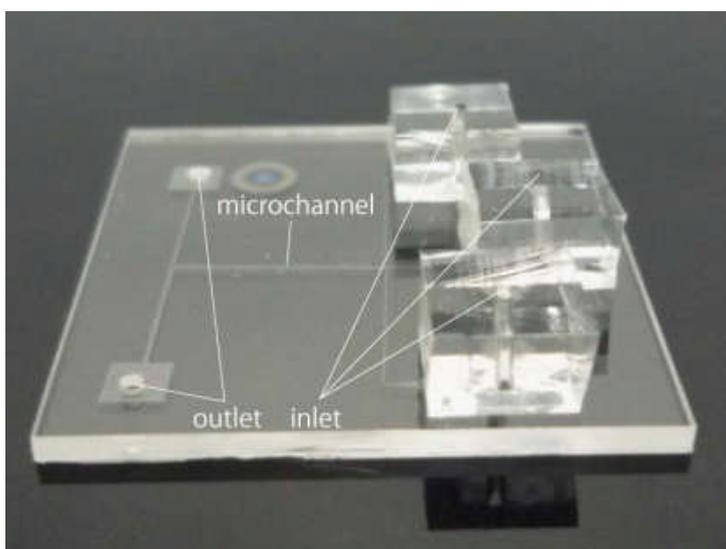
本研究では、膜タンパク質に対し、両側から環境の変化や分子が供給できる新しい流路構造を持つガラスデバイスを開発した（図①-(1A)-1.26）。



図①-(1A)-1.26 デバイスの構造模式図

開発したデバイスの構造上の特長は、流路が2本あり、その流路間に微小孔を設けた点である。この構造の主な利点は2点あり、1点目は、デバイス内に

形成された脂質二重膜に導入したタンパク質に対し、2本の流路を利用し、両側から環境の変化や分子の供給などの操作を加えることができるため、条件検討における自由度が高くなること。2点目は、2本の流路の導入口にそれぞれ電極を挿入するだけで、簡単に電流計測が可能であり、電極をデバイス内に構成することがないため、デバイス構造が単純化できる。デバイスの製造方法(ガラスエッチング、ガラスボンディング等)は要素研究において確立したプロセスを使用した。完成したデバイスを写真(図①-(1A)-1.27)に示す。

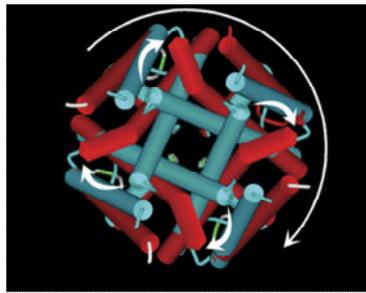


図①-(1A)-1.27 ガラスデバイス写真

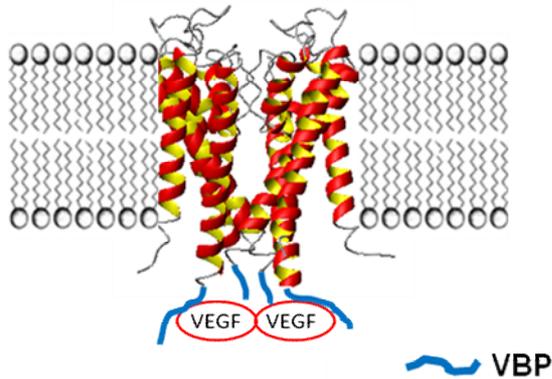
このデバイスを用い、ナノポアタンパク質である α ヘモリシンの電気シグナル計測を実施した。脂質溶媒ヘキサデカンに溶解させた 15mg/ml DPhPC とバッファ (500mM KCl, 10ug/ml α ヘモリシン, pH7.0) を用いて、電流計測を実施した。印加電圧は 60mV で測定を行った。

c. KcsA のサブクローニング

KcsA 全長(1-160) 残基をコードし 5'末端に NdeI 配列、3'末端に BamHI 配列をもった DNA について、全合成を Genscript 社に委託し行った。全 DNA 配列は以下の通りである。



赤 : open form
青 : close form



図①-(1A)-1.28 KcsA の開閉モデル

左 : 細胞内側から見た KcsA の膜貫通ヘリックス (文献 1 より引用)

右 : C 末端に VBP を融合させた改変型 KcsA モデル

KcsA 改変体の作製は PCR 法により行った。KcsA(1-124)、KcsA(1-125)、KcsA(1-135)、KcsA(1-160)について C 末端に VBP を融合させた。

・プライマー

Forward:

TGCGCAAATTTCAACCCAACCACGTTCTTCCGCCGCTTTTTCGGAG

Reverse(1-124):

TGCGCAAATTTCAACCCAACCACGGTGACCACGGCGTTCTTGTTT

Reverse(1-125):

TGCGCAAATTTCAACCCAACCACGGAAGTGACCACGGCGTTCTTG

Reverse(1-135):

TGCGCAAATTTCAACCCAACCACGTTCTTCCGCCGCTTTTTCGGAG

Reverse(1-160):

TGCGCAAATTTCAACCCAACCACGACGGCGGTTGTCCAGCATA

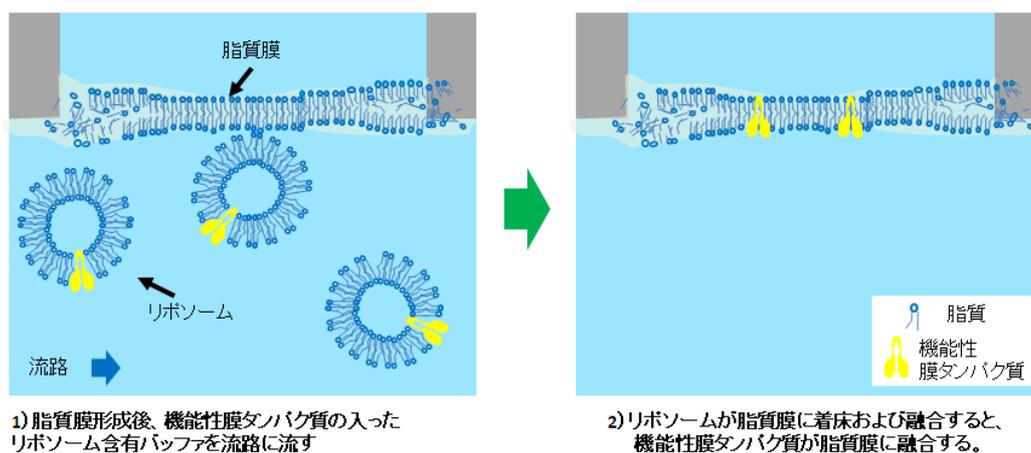
KcsA(1-160) の DNA 配列を挿入したベクター pET16b を用いて、PCR を行った後、制限酵素 DpnI を 37°C、1 時間反応させることで、鋳型ベクターの分解を行った。キナーゼ/リガーゼを 16°C、1 時間反応させて PCR 産物のセルフライゲーションを行った後、大腸菌 DH5α 株の形質転換を行った。その後、得られたベクターに対して DNA シークエンス解析を行い、目的の DNA 配列が挿入されていることを確認した。

e. KcsA の発現・精製

野生型および改変型 KcsA は大腸菌 BL21(DE3)株で発現させた。LB 培地で培養を行い、OD600=0.5 の時に終濃度が 0.5 mM になるように IPTG を添加し、30°C で一晩培養を行った。菌体回収後、-20°C で菌体を凍結させた。菌体解凍後、破碎バッファ (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 150 mM KCl, 1%(w/w) n-Decyl-β-D-maltoside (DM), pH 7.5) に溶解させ、Bioruptor (コスモバイオ) で超音波破碎 (200 W, 30 sec on 30 sec off, 4°C, 30 分間) を行い、遠心分離した (14000 rpm 4°C, 10 分間)。上清画分を HisPur Cobalt Resin (サーモサイエンティフィック) にアプライし、洗浄後 (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 150 mM KCl, 0.1% n-Dodecyl-β-D-maltoside (DDM), 50 mM Imidazole, pH 7.5)、溶出を行った (50 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 150 mM KCl, 0.1% DDM, 500 mM Imidazole, pH 7.5)。

f. マイクロ流路デバイス中に形成させた人工膜に対するリポソームの導入

機能性分子を脂質二重膜に導入する方法として、リポソーム導入法を検討した。この方法は、機能性分子を融合させたリポソームをデバイス内の脂質二重膜に着床させ、リポソームが自然と脂質二重膜に融合することにより、機能性分子が脂質二重膜に導入される方法である。(図①-(1A)-1.29 リポソーム導入法の概要)

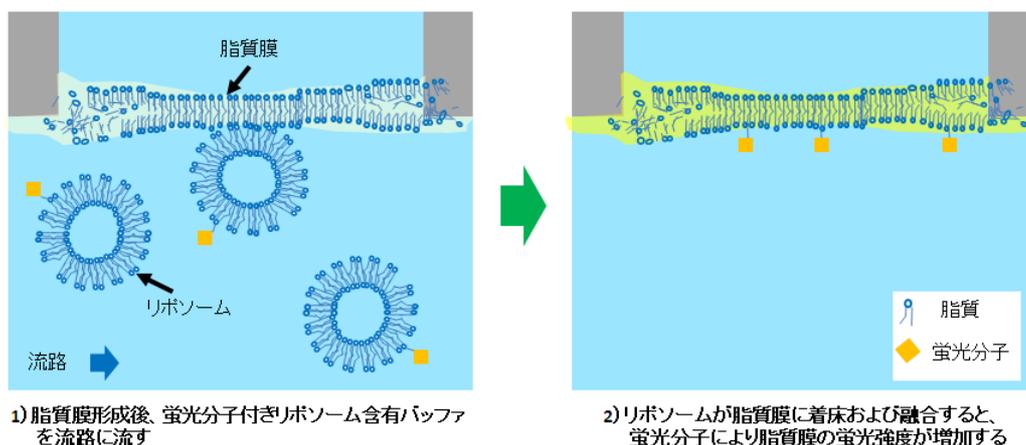


図①-(1A)-1.29 リポソーム導入法の概要

・実験概要

リポソーム導入法において、リポソームを構成する脂質が機能性分子を脂質

膜に効率良く融合させる上で重要な要因になると予測。そこで、リポソームを構成する脂質の種類を変えたものを2種類製作し、脂質の差異による脂質膜への着床と融合への影響を調査した。尚、リポソームの脂質膜への着床と融合について可視化評価できるように、脂質に蛍光分子を結合させたものをリポソームに混入し、脂質膜の蛍光輝度で評価を実施した。(図①-(1A)-1.30)



図①-(1A)-1.30 蛍光輝度評価法の概念

・実験方法

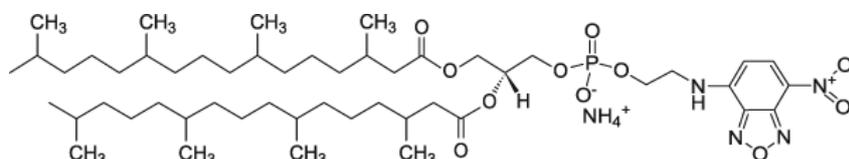
以下の手順で、リポソームを形成する脂質の種類を変えて実験を実施した。尚、比較した脂質は、POPC と POPC+POPG 混合の2種類である。

<材料>

1. デバイス内脂質二重膜 使用溶媒および脂質
 バッファ：10mM リン酸 150mM NaCl (pH6.5)
 脂質：1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPhPC)
 +Hexadecane (脂質濃度：15mg/ml)
2. リポソーム1 構成脂質 POPC
 バッファ：10mM リン酸 150mM NaCl (pH6.5)
 脂質：1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine (POPC)
 蛍光分子 (蛍光性物質)：1,2-diphytanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanol-amine-N-(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl) (NBD-DPhPE) (図①-(1A)-1.31)
3. リポソーム2 構成脂質 (POPC : POPG=2 : 1)
 バッファ：10mM リン酸 150mM NaCl (pH6.5)

脂質：POPC, 1-palmyoyl-2-oleoylphosphatidylglycerol (POPG)

蛍光分子：NBD-DPhPE



図①-(1A)-1.31 NBD-DPhPE の構造

<流速>

1. デバイス内脂質二重膜 使用溶媒および脂質
バッファ：0.1~0.3ul/min
脂質：1ul/min
2. リポソーム 1 構成脂質 POPC
リポソーム 1 含有バッファ：0.1ul/min
3. リポソーム 2 構成脂質 (POPC : POPG=2 : 1)
リポソーム 2 含有バッファ：0.1ul/min

<使用機器>

1. 倒立顕微鏡
オリンパス株式会社製 IX-71
2. 蛍光イメージング撮像・解析システム
浜松ホトニクス株式会社製 アクアコスモス ORCA-R2
3. マイクロシリンジポンプ
KDS 社製：Model210

・蛍光標識リポソームの作成

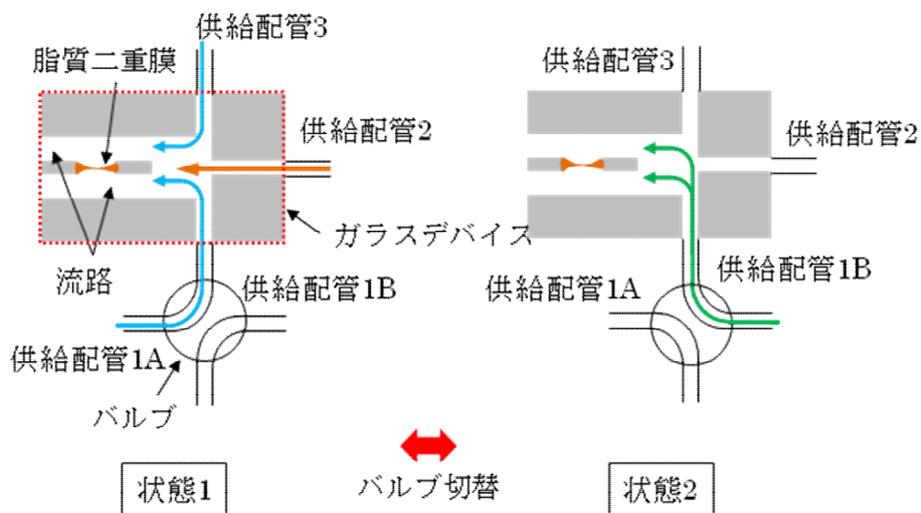
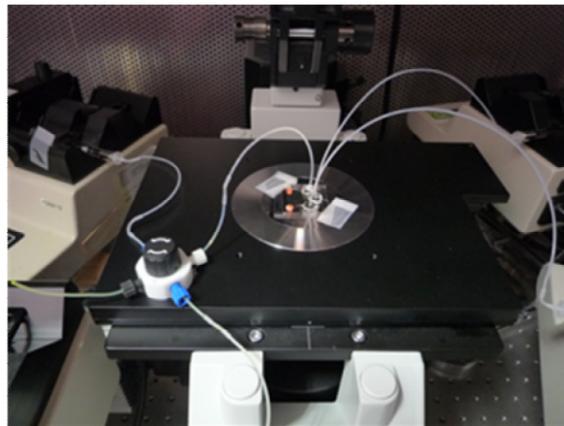
POPC 40mg (または POPC 13.3mg/POPG 26.6mg (2:1)) , NBD-DPhPE 1 mg をクロロホルム 5 ml に溶解させた。40℃の水浴中でロータリーエバポレーターによりクロロホルムを蒸発させた後、バッファ (10mM リン酸, 150mM NaCl, pH6.5) 4 ml を加えボルテックスを行った。液体窒素を用いて凍結融解を 5 回繰り返す、50 nm のフィルタをリポソーム製造装置 Mini-Extruder (Avanti Polar Lipids) に付け、20 回通したものをリポソームとした。作成したリポソームについて分光蛍光光度計 FP-6500 (日本分光) で蛍光測定を行った。

・デバイスへの脂質二重膜形成と蛍光輝度評価

バッファおよび脂質を含んだ溶媒をデバイス内にマイクロシリッジおよびマイクロシリッジポンプを用いて挿入し、脂質二重膜を形成させた。脂質膜形成後にリポソーム含有バッファ（容量 12ul）をデバイス内に 0.1ul/min の流速で挿入した（挿入時間 2 時間）。リポソーム含有バッファ挿入終了後、バッファに切り替え、0.1ul/min の流速で挿入した。脂質膜部分および膜部近傍を倒立顕微鏡および高解像度デジタル CCD カメラにて 20 秒毎に蛍光画像を撮像し、蛍光輝度解析を行った。

・マイクロ流路デバイスへの導入

マイクロ流路デバイス及びその流路について写真および図のように組み立てた (図①-(1A)-1.32)。



図①-(1A)-1.32 マイクロ流路デバイスの流路図

状態 1 で、デバイスの流路に、供給配管 2 からヘキサデカン (DPhPC 濃度 : 10 mg/ml) を満たし、その後、供給配管 1A および 3 から バッファ (PBS) を流し、脂質二重膜を形成した。次に、バルブを切替え、状態 2 にし、供給配管 1B から蛍光標識リポソームをデバイス中に約 4 時間流した。再びバルブを切り替えて状態 1 にして供給配管 1A から PBS を流し、デバイス中のリポソームを洗い流した後、人工膜に導入された蛍光リポソームを蛍光顕微鏡で観察した。その間、流速は 0.1 μ l/min、温度は室温で行った。

g. マイクロ流路デバイスによる KcsA のイオンチャネル活性の電流計測

・プロテオリポソームの調製

POPC 60 mg をクロロホルム 3 ml に溶解させ、ナス型フラスコに入れた。40°C の水浴中でロータリーエバポレーターによりクロロホルムを蒸発させた後、バッファ 3 ml (20 mM HEPES-KOH, 400 mM KCl, pH7.5) を加えてボルテックスを行った (終濃度 : 20 mg/ml POPC)。液体窒素と 40°C の浴槽を使用して凍結融解を 5 回行った。各サイクルでボルテックスにより 5 秒間攪拌を行った。100 nm フィルタを装着した Mini-Extruder に、懸濁した脂質溶液を 20 回通し、リポソームを作成した。精製した KcsA、20 mg/ml リポソーム溶液、10% OG を用いて、終濃度が 10 μ g/ml KcsA、10 mg/ml lipid (lipid : KcsA = 1000 : 1)、0.32% OG になるように混合した後、室温で 20 分間放置した。Bio-Beads SM-2 Adsorbent (バイオラッド) を用いて界面活性剤を除去し、プロテオリポソームとした。

・電流計測

ヘキサデカンに溶解させた 15 mg/ml DPhPC およびバッファ (500 mM KCl, pH4.0) を用いて流路デバイスに脂質二重膜を形成させた。片側の流路にプロテオリポソームを 100 倍希釈して加え、印加電圧 100 mV で測定を行った。

h. プロテオリポソームの TEM 観察

0.2 mg/ml プロテオリポソーム (20 mM HEPES-KOH, 400 mM KCl, pH7.5) をカーボン支持膜貼付メッシュ (日新 EM) へのせ、2%(w/v) ウラニル酢酸によりネガティブ染色を行い、乾燥させたサンプルを Philips Tecnai F20 により観察した。

i. プロテオリポソームの粒度分布測定

プロテオリポソーム (20 mM HEPES-KOH, 200 mM KCl, pH7.5) を 0.5 mg/ml に

調整し、動的光散乱法により粒度分布を測定した (Malvern ゼータサイザーナノ ZS).

j. 接触法を用いた膜デバイスによる KcsA のイオンチャネル活性の電流計測

・プロテオリポソームの調製

POPE 60 mg, POPG 20 mg をクロロホルム 5 ml に溶解させた後、ナス型フラスコに入れ、40°Cの水浴中でロータリーエバポレーターによりクロロホルムを蒸発させた。バッファ 4 ml (30 mM HEPES-NaOH, 1 mM EGTA, 600 mM NaCl, 400 mM sucrose, pH7.4) を加えてボルテックス、およびフラスコのまま超音波処理を行い脂質を懸濁させた (Bioruptor, コスモバイオ, 130 W, 120 sec)。脂質懸濁液を 15 ml チューブに移し、超音波処理を行った (200 W, 120 sec)。終濃度が 10 mg/mL lipids, 10 µg/mL KcsA, 37 mM CHAPS, 15 mM HEPES-NaOH, 0.5 mM EGTA, 300 mM NaCl, 200 mM sucrose, pH7.4 になるように、まず 20 mg/ml lipids, 163 mM CHAPS, MilliQ 水を混合し、室温で 2 時間放置した。その後、KcsA を加え、20 分間放置した (lipids : KcsA = 1000 : 1)。Bio-Beads SM-2 Adsorbent を用いて界面活性剤を除去し、プロテオリポソームとした。

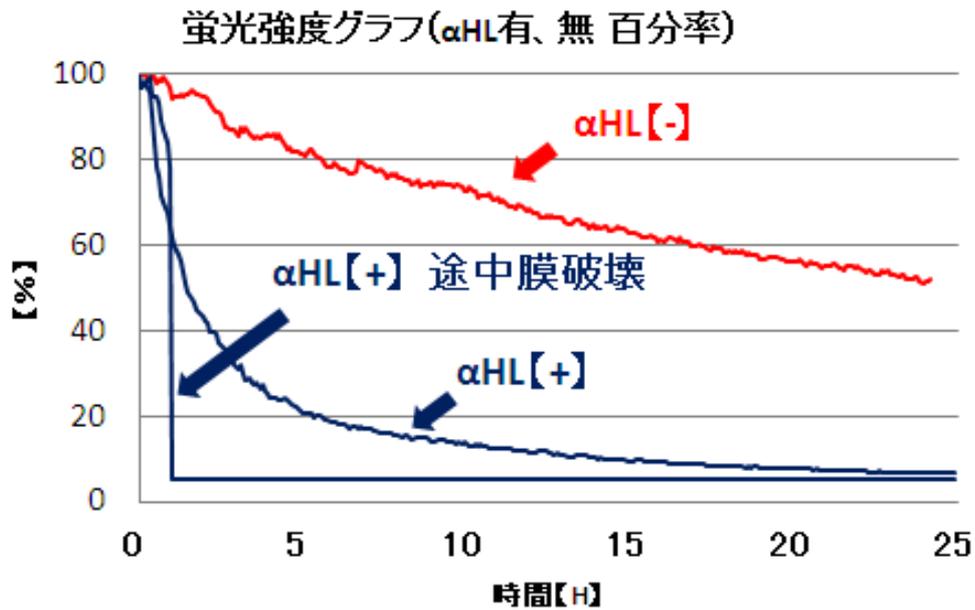
・電流計測

接触法 2) を用いた人工脂質二重膜デバイスを用いて KcsA のイオンチャネル活性の電流計測を行った。脂質二重膜はデカンに溶解させた Egg PC を用いて形成させた。プロテオリポソームを Cis 側のバッファ (5 mM HEPES-KOH, 130 mM KCl, pH7.2) に加えた。Trans 側には pH4.0 のバッファ (5 mM Succinic acid, 100 mM KCl) を使用し、印加電圧 100 mV で測定を行った。

(1A)-1-3-4 結果、考察

α. 脂質二重膜の 24 時間以上の形成と機能性分子の機能発現の確認

αヘモリシン有と無の蛍光強度の変化を比較したところ、αヘモリシン有の方が、無の場合と比較し、蛍光強度の減少速度が増している。特に開始から 2～3 時間において蛍光強度減少の傾きが急である (図①-(1A)-1.33)。この結果から、αヘモリシン無の場合は、蛍光観察によるカルセインの退色で、αヘモリシン有の場合は、蛍光観察によるカルセインの退色に加え、αヘモリシンが脂質二重膜に特異的に融合し、ナノポアからカルセインが抜けることによる蛍光強度の減少を示していると考えられる。この結果より、脂質二重膜が形成できたと示唆される。



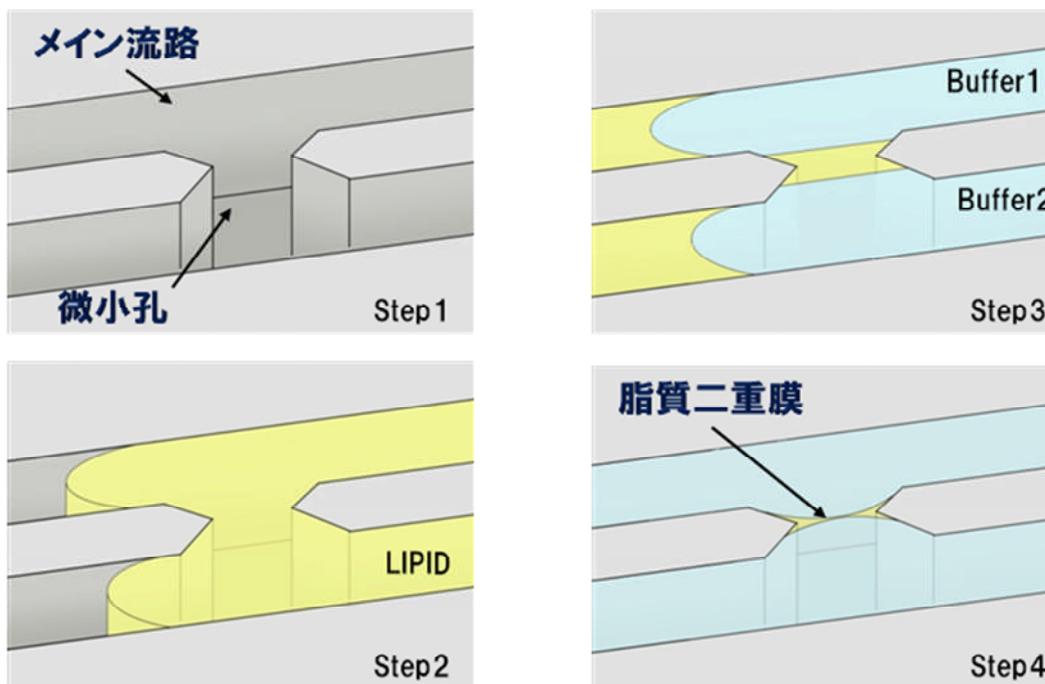
図①-(1A)-1.33 蛍光強度グラフ

b. 電流計測型ガラスデバイスを用いた脂質二重膜形成とナノポアタンパク質の電流計測

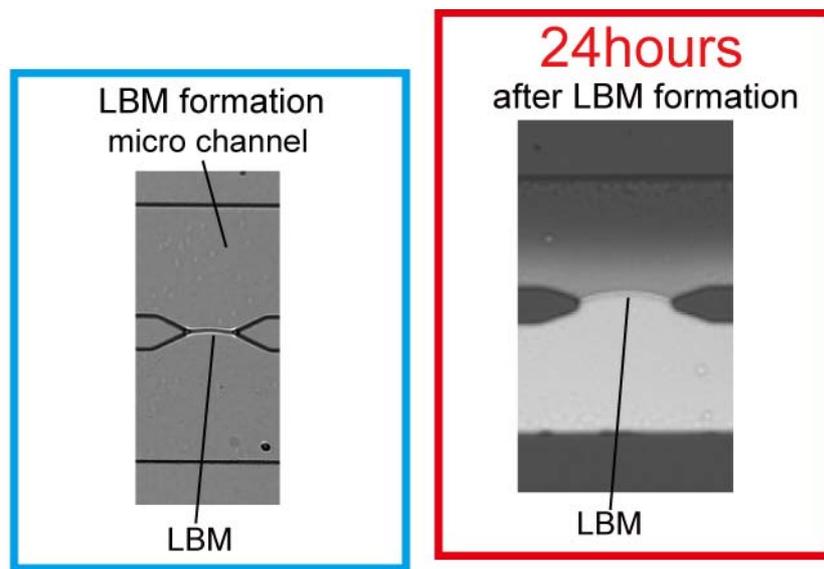
・脂質二重膜の形成

開発したデバイスで、脂質二重膜を形成した。以下に膜の形成方法を示す(図①-(1A)-1.34)。最初に流路中に脂質溶媒ヘキサデカンに溶解させた DPhPC 脂質 (15mg/ml) を流し、流路中に充満させる。次に、2本の流路共にバッファ (HBSS) を流す。それにより、流路中の脂質溶媒をバッファが押し流すが、流路間にある微小孔には脂質溶媒が残る。さらに流路にバッファを流し続けることにより微小孔の脂質溶媒が薄くなり、脂質二重膜を形成する。

実際に形成した脂質二重膜の写真を図①-(1A)-1.35 に示す。結果は、24 時間以上の脂質膜の形成が確認できた。



図①-(1A)-1.34 脂質二重膜の形成方法

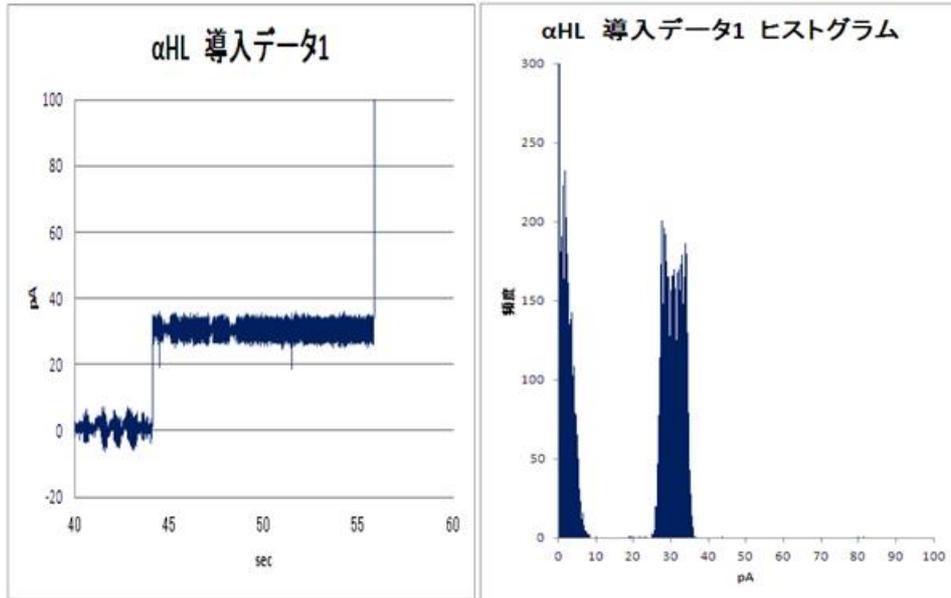


図①-(1A)-1.35 脂質二重膜の24時間形成写真

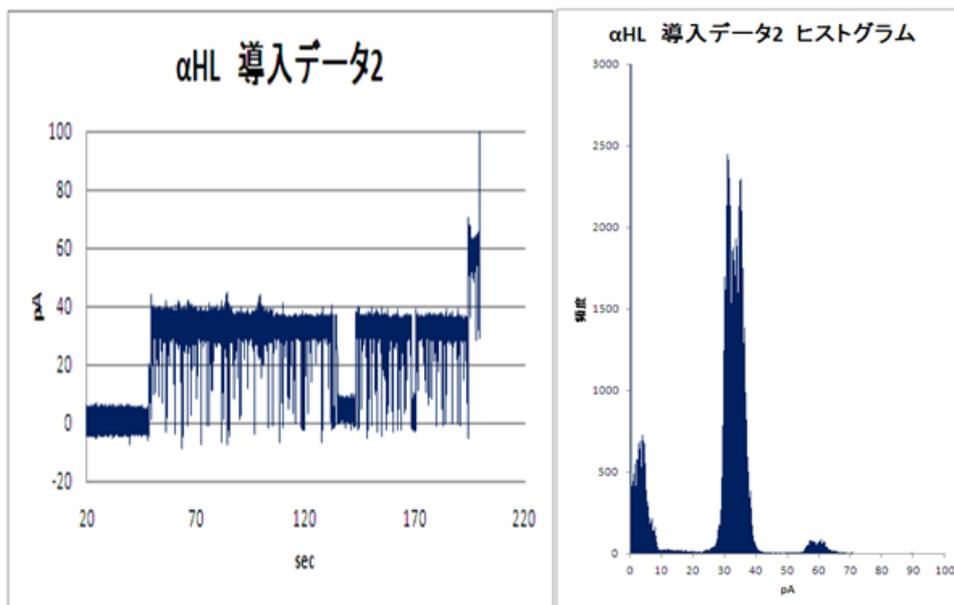
・ナノポアタンパク質の電流計測

脂質溶媒ヘキサデカンに溶解させた 15mg/ml DPhPC とバッファ (500mM KCl, 10ug/ml α ヘモリシン, pH7.0) を用いて、電流計測を実施した。印加電圧は 60mV で測定を行った。結果は、図①-(1A)-1.36 に示す通り、0 ステップ状の電流上昇が確認できた。また、電流データをヒストグラムにしたところ、約

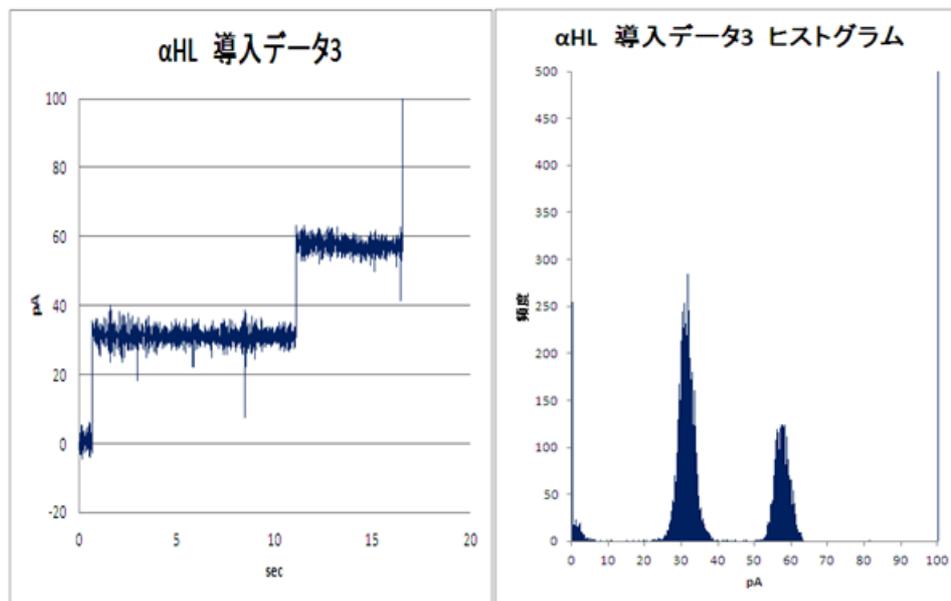
30pA の電流上昇を示している。また、デバイスを変え、複数回同様の実験を実施した (図①-(1A)-1.37, 図①-(1A)-1.38)。その結果、 α ヘモリシンの導入が確認され、また、電流上昇も約 30pA を確認する事ができた。以上により、デバイスを変更しても再現良く α ヘモリシンの電流シグナル測定ができることを確認した。



図①-(1A)-1.36 α ヘモリシン電流シグナルデータ 1



図①-(1A)-1.37 α ヘモリシン電流シグナルデータ 2



図①-(1A)-1.38 α ヘモリシン電流シグナルデータ 3

・電流上昇値の検証

次に、電流上昇値（今回の実験では約 30pA）についての妥当性を検証した、まず、 α ヘモリシンのコンダクタンスは、1nS（1M KCl）1）である。今回の条件（使用バッファ：500mM KCl、 α ヘモリシン 10ug/ml 印加電圧 60mV）で電流の上昇値を下記式で計算すると、30pA となり、今回の実験で計測した電流上昇値と符号する。

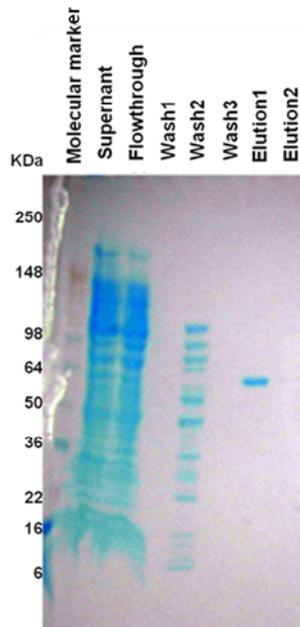
$$\begin{aligned} \text{予測電流上昇値 (A)} &= \text{濃度} \times \text{印加電圧 (V)} \times \text{コンダクタンス (S)} \\ &= 0.5 \times 60\text{mV} \times 1\text{nS} \\ &= 30\text{pA} \end{aligned}$$

従って、この結果から、デバイス内に形成した脂質二重膜に α ヘモリシンが導入され、 α ヘモリシンのナノポアによるイオンの流れ（シグナル電流）が計測できている事を証明した。

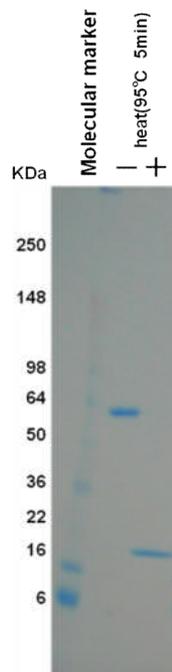
c. KcsA の調製

野生型 KcsA(1-160)を大腸菌により発現させ、各精製段階のサンプルについて SDS-PAGE を行った（図①-(1A)-1.39）。その結果、Elution1 から 4 量体の KcsA(1-160)が純度良く精製された。一般にタンパク質は SDS-PAGE を行う際、強力な変性剤 SDS により変性されてしまう。しかし、KcsA(1-160)は非常に強

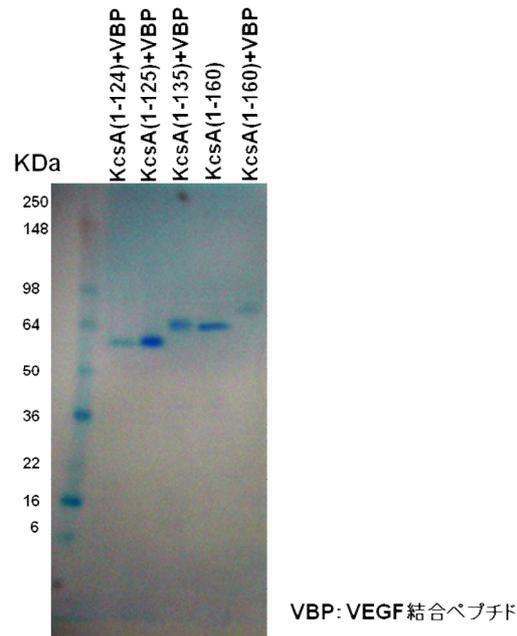
固な 4 量体を形成するため、SDS 存在下の SDS-PAGE ゲル中でも 4 量体を維持することができる。Elution1 のサンプルについて 95°C, 5 分間の熱処理を行うことで、KcsA(1-160)が完全に変性し、4 量体が単量体になることが確認できた(図①-(1A)-1.40)。



図①-(1A)-1.39 KcsA(1-160)の精製結果



図①-(1A)-1.40 KcsA(1-160)の加熱変性

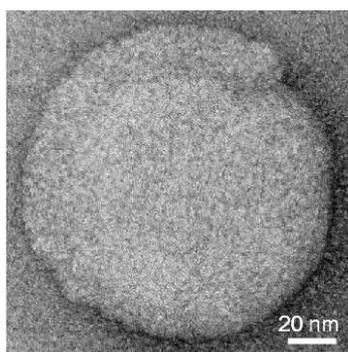


図①-(1A)-1.41 KcsA 変体の精製結果

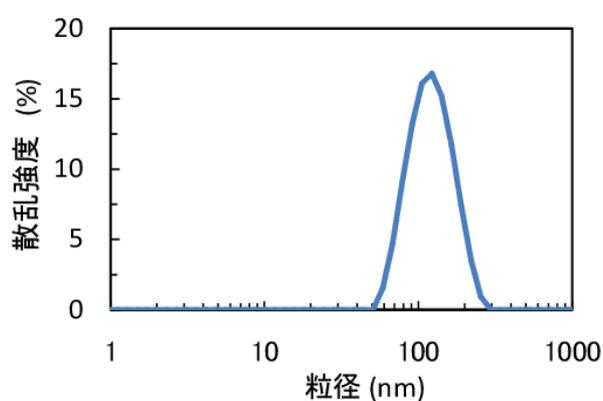
KcsA 変体 ((1-124)+VBP, (1-125)+VBP, (1-135)+VBP, (1-160)+VBP) について精製を行った結果、KcsA(1-124)+VBP および KcsA(1-160)+VBP については大腸菌内の発現量が比較的低かったものの、いずれも純度良く精製することができた (図①-(1A)-1.41)。

d. プロテオリポソームの物性評価

KcsA(1-135)+VBP を組み込んだプロテオリポソームについて TEM 観察を行った結果 (図①-(1A)-1.42)、球状の形態をしたプロテオリポソームが観察された。動的光散乱法による粒度分布測定を行ったところ、粒度分布において単一のピークが得られ、KcsA(1-135)+VBP を組み込んだリポソームは約 100 nm の粒径で存在していることが分かった (図①-(1A)-1.43)。また、脂質 : KcsA(1-135)+VBP = 20:1 で調製したプロテオリポソームに対して SDS-PAGE を行ったところ、KcsA(1-135)+VBP のバンドが検出され、KcsA(1-135)+VBP はリポソームに組み込まれたことが示された (図①-(1A)-1.44)。



図①-(1A)-1.42 KcsA(1-135)+VBP プロテオリポソームの TEM 観察



図①-(1A)-1.43 KcsA(1-135)+VBP プロテオリポソームの粒度分布測定



図①-(1A)-1.44 KcsA(1-135)+VBP プロテオリポソームの SDS-PAGE 結果

e. マイクロ流路デバイスに形成させた人工膜に対するリポソームの導入

POPC および NBD-DPhPE で構成される蛍光標識リポソームの溶液を 500 倍希釈し、励起波長 465 nm で蛍光測定を行った (図①-(1A)-1.45)。その結果、脂質に標識されている蛍光物質 NBD 特有の 530 nm に極大蛍光波長を持つ蛍光スペクトルを測定することができた。

作成したリポソームを、人工膜を形成させたデバイスに注入し、蛍光顕微鏡で撮影した写真を図①-(1A)-1.46 (A) に示す。

蛍光標識リポソーム溶液からリン酸バッファに流路を切り替えた後、時間経過に従い流路中の蛍光が消失するが、流路から蛍光が完全に消失後、流路間に形成された人工膜から蛍光が観察できた。ここで、人工膜の輝度も合わせて計測した。結果は、膜部の輝度が、膜上下の流路部と比較し高い値を示している。また、30分程度輝度を維持している。尚、輝度計測実験は2度実施した。

リポソームの構成脂質を POPC、POPG 混合 (POPC : POPG=2 : 1) にした場合の蛍光輝度実験結果を以下に示す(図①-(1A)-1.47, 図①-(1A)-1.48)。POPC で構成されるリポソームとは異なり、測定開始直後より、膜部の蛍光輝度は膜部近傍の流路部とほぼ同等で、ほぼ輝度 0 であった。POPC および POPG の混合で構成したリポソームが、膜に着床している事は確認できなかった。

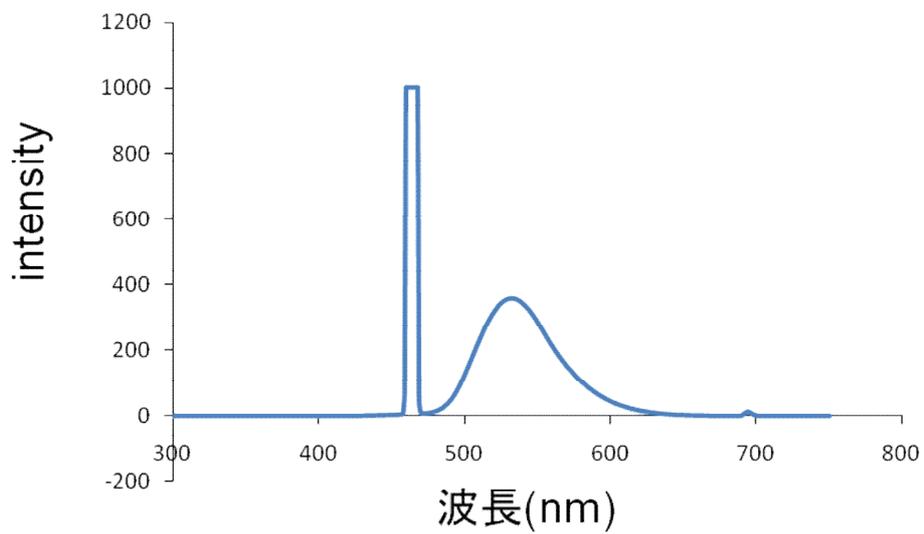
(考察)

構成脂質 (POPC および POPC、POPG の混合) が異なる2種類のリポソームにおいて、脂質膜に対し着床および融合し易さを比較したところ、両者において差が見られた。結果は、比較的顕著に、脂質 POPC で構成したリポソームの方が、脂質膜に対し着床し易い事を示す結果が得られた。

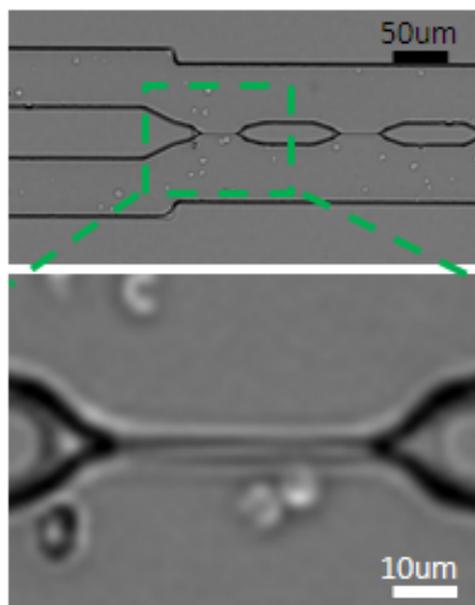
ここで、リポソームを構成する脂質の違いにより差異が出たことを考察する。構成する脂質の違いによるリポソームの表面電位に着目してみると、脂質 POPC で構成したリポソーム膜表面は中性の荷電となる。また、デバイス内に形成された脂質二重膜の脂質 DPhPC も中性電荷である。一方、脂質 POPG を使用したリポソーム膜表面はマイナスに帯電しており、リポソーム同士は荷電で反発し、リポソームとしての安定性が POPC より高いと考えられる。このことから、POPG リポソーム同士が反発するため、脂質膜上で密に着床しない。また、着床しても安定性が高いため融合に至らないと考えられ、その結果、蛍光強度の差として顕著に出たと推測できる。

以上の結果より、デバイス中の人工膜に POPC で構成される蛍光標識リポソームがリポソーム融合により導入されたことが示唆された。人工膜に機能を持たせるには、膜タンパク質を再構成したプロテオリポソームをデバイス中の人工膜に導入することが不可欠である。今回、人工膜に対してリポソームを約3時間暴露させた。実用的なデバイスとして成立させるためには、短い暴露時間で効率的にプロテオリポソームを人工膜に導入させることが重要である。効率的にプロテオリポソームを人工膜に導入させるためには溶液を流す流速や溶液の成分、プロテオリポソームおよび人工膜の脂質の成分、プロテオリポソ-

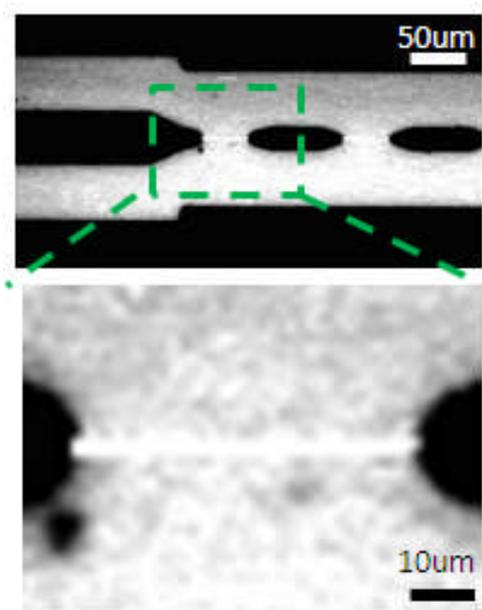
ム中に含まれる膜タンパク質の量、温度など多岐にわたる検討が必要であると
考えられる。



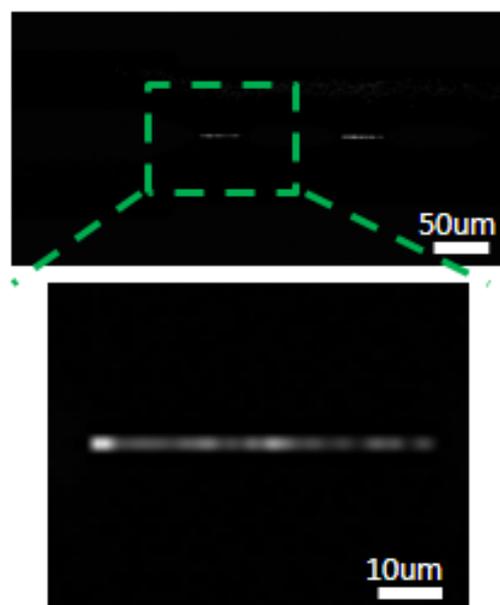
図①-(1A)-1.45 蛍光標識リポソームの蛍光スペクトル



(A)

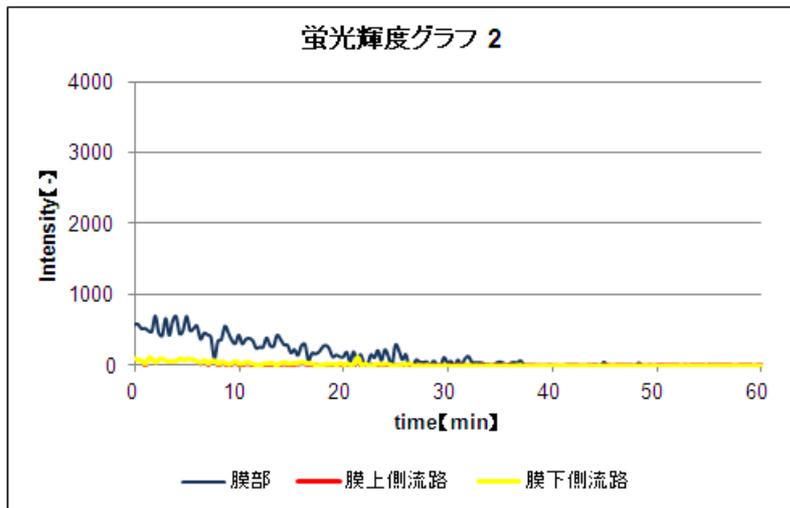
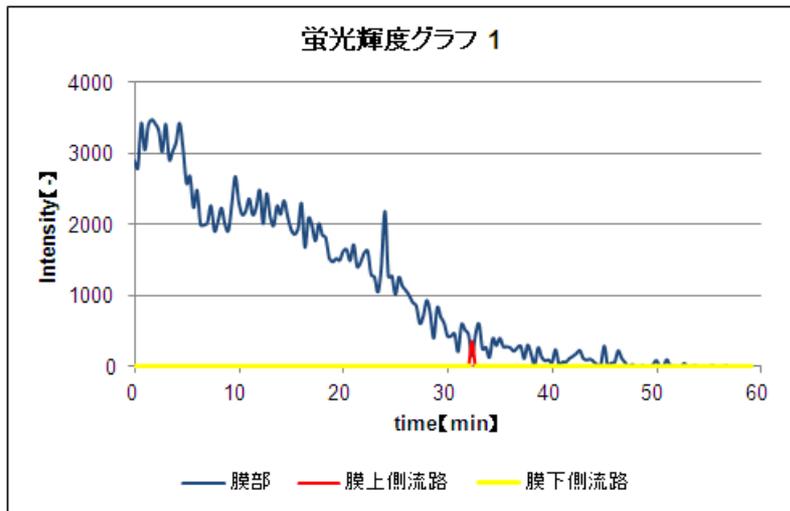


(B)

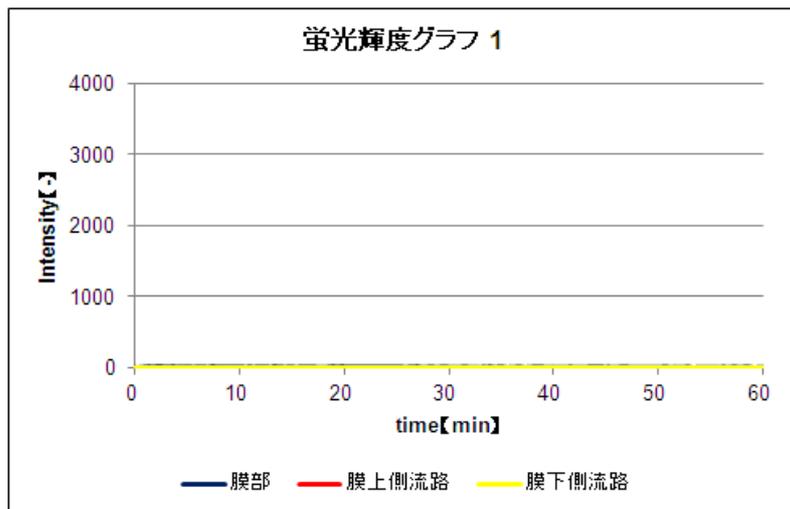


(C)

図①-(1A)-1.46 マイクロ流路デバイス中の人工膜に対する蛍光標識リポソーム融合実験 (A) : 脂質二重膜が流路中に形成された状態, (B) : 蛍光標識リポソームを流路に流している状態, (C) : 蛍光標識リポソームが流路から消失した時の脂質二重膜



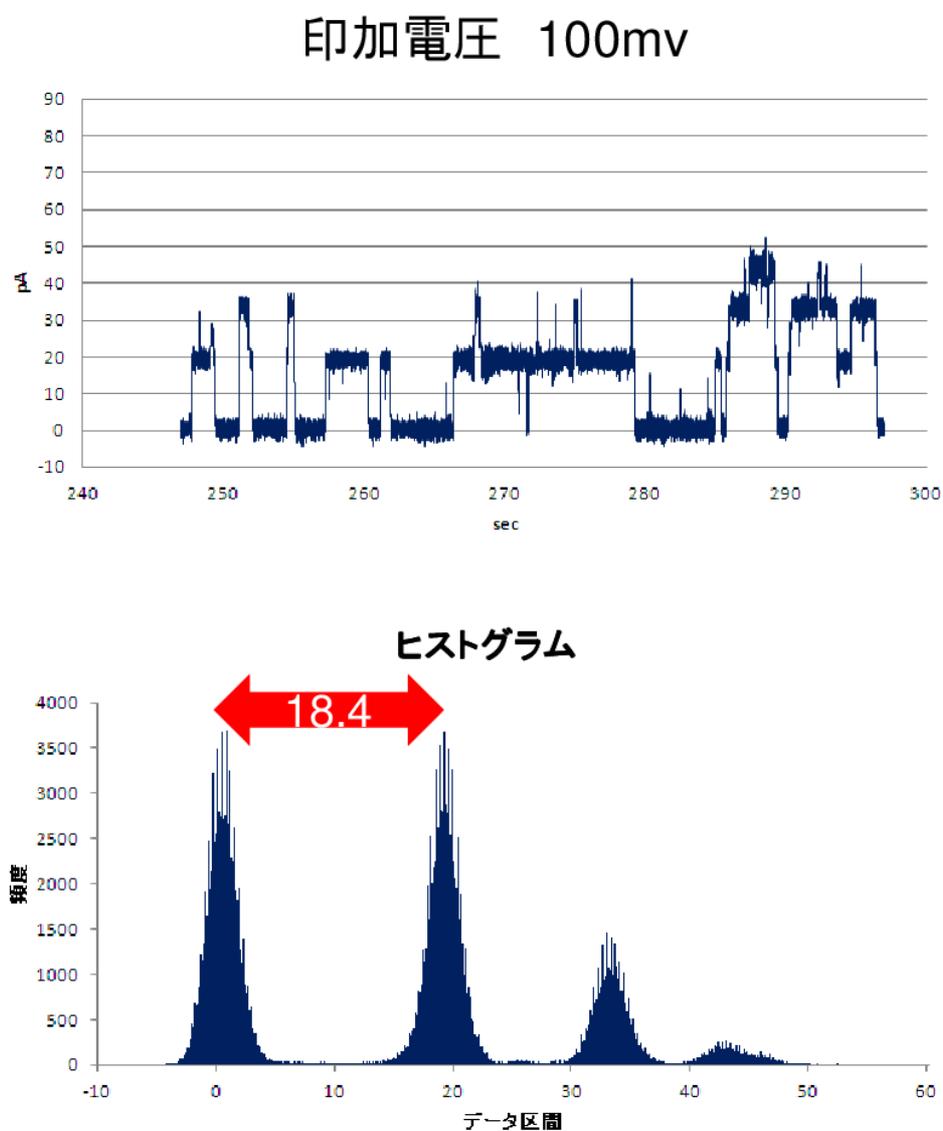
図①-(1A)-1.47 脂質膜輝度計測 (POPC)



図①-(1A)-1.48 蛍光分子による脂質膜蛍光輝度 (POPC : POPG=2 : 1)

f. マイクロ流路デバイスによる野生型 KcsA のイオンチャネル活性の電流計測

マイクロ流路デバイスを用いて野生型 KcsA のイオンチャネル活性の電流計測を行った。その結果、野生型 KcsA のカリウムイオンチャネル活性が電流シグナルとして検出される結果を得ることができた (図①-(1A)-1.49)。ヒストグラム解析を行った結果、KcsA のゲートのクローズとオープンの頻度は明確に分かれ、複数の KcsA 分子の活性が検出されたことが示唆される。以上より、マイクロ流路デバイスの開発に成功したこと、さらに機能性膜タンパク質のデバイスへの導入に成功したことが示された。

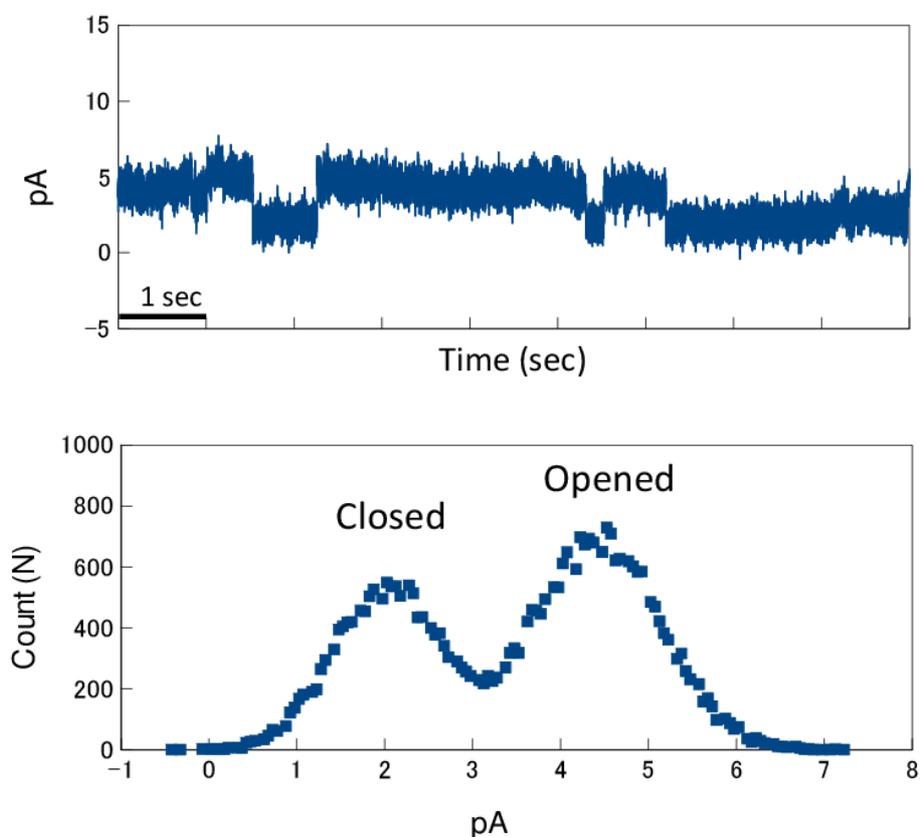


図①-(1A)-1.49 野生型 KcsA のカリウムイオンチャネル活性 (100 mV)

g. 接触法を用いた膜デバイスによる KcsA 改変体のイオンチャネル活性の電流計測

KcsA(1-135)+VBP の電流計測を行った (Cis 側 : pH7.2, Trans 側 : pH4.0)。その結果、KcsA(1-135)+VBP のカリウムイオンチャネル活性が電流シグナルとして検出される結果を得ることができた (図①-(1A)-1.50)。ヒストグラム解析を行った結果、KcsA のゲートのクローズとオープンの頻度は明確に分かれ、電流値の差は 2.5 pA となった (図①-(1A)-1.50)。この結果より、血管内皮細胞増殖因子 VEGF の結合ペプチド配列を付加した KcsA 改変体 ((1-135)+VBP) は、カリウムイオンチャネルとしての活性を持つことが明らかになり、また、膜デバイス上における動作を確認することができた。

一方、KcsA(1-135)+VBP と VEGF との相互作用実験を SPR 法により行ったが、再現性のある明確な相互作用のデータは現時点で得られていない。脂質膜上における KcsA 改変体と VEGF との相互作用については検討が必要だと考えられる。

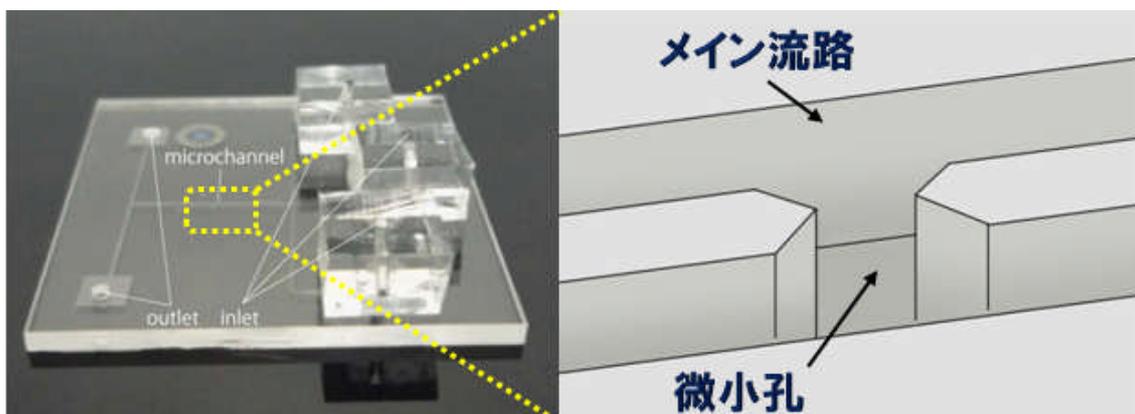


図①-(1A)-1.50 KcsA(1-135)+VBP の電流計測

(1A)-1-4 まとめ

(1A)-1-4-1 最終成果

脂質二重膜を長期安定して形成ができるガラスデバイスを開発し、24 時間以上の生化学的な機能発現の検証として、ナノポアタンパク質である α ヘモリシンと蛍光分子であるカルセインを用いて蛍光観察にて確認した。結果は、図①-(1A)-1.33 に示す通りに、 α ヘモリシン有と無の蛍光強度の変化を比較したところ、 α ヘモリシン有の方が、無の場合と比較し、顕著に蛍光強度の減少速度が増すことを 24 時間連続で観察することができた。これにより、24 時間以上の生化学的な機能発現の確認ができたと考える。また、より確実な脂質二重膜の形成と機能性分子および膜タンパク質の解析の実証と将来的なモジュールの実用化を見据え、ガラスデバイスの構造を見直し、膜タンパク質の動作を電気的に測定できるデバイスに改良した（図①-(1A)-1.51）。その改良したガラスデバイスを用い、ナノポアタンパク質 α ヘモリシンの電流シグナル（ステップ状の電流上昇）の計測に成功した（図①-(1A)-1.36～38）。



図①-(1A)-1.51 開発したガラスデバイスと構造模式図

さらに、上記デバイスを使用し、膜タンパク質（カリウムチャネル）KcsA（野生型）の電流シグナル測定に成功した。これにより、 α ヘモリシンのように水溶性で、そのまま脂質二重膜への導入が可能なタンパク質だけでなく、KcsA のようなプロテオリポソーム形態として脂質二重膜に導入する必要がある機能性膜タンパク質（イオンチャネル）の電流計測に成功した。この結果は、今後の膜タンパク質の機能解析技術の飛躍的發展に寄与すると期待される。近い将来のアプリケーションとしては、パッチクランプ装置の代替え技術として、膜タンパク質の解析デバイスやツールが考えられる。また、マルチアレイ化お

よび高スループット化を図ることで、創薬開発に必要な創薬スクリーニングデバイスへの発展が見込まれる。

(膜タンパク質の人工膜組み込みプロセスの開発)

血管内皮細胞増殖因子 VEGF と結合する VEGFR1 を改変した膜タンパク質を作製し、大腸菌発現系による発現、精製について検討を行った。SPR 法により、結合活性の高い膜タンパク質が精製できたことを確認した。

さらに、蛍光標識リポソームを用いて、上記にあるガラスデバイス中に形成させた人工膜へのリポソーム導入を蛍光計測にて確認した。

(膜タンパク質 (カリウムイオンチャネル KcsA 改変体) の電流シグナル計測)

放線菌 *Streptomyces lividans* 由来カリウムイオンチャネル KcsA の遺伝子を用いて、VEGF 結合ペプチド配列を付加した KcsA 改変体を作製し、大腸菌発現系により発現、精製を行った。KcsA 改変体を脂質二重膜リポソームに組み込み、プロテオリポソームを作成した。プロテオリポソームを介して KcsA 改変体を膜デバイスに導入することに成功し、電流計測によって KcsA 改変体のイオンチャネルとしての動作を確認した。

(1A)-1-4-2 今後の展開

本研究において、長時間安定して脂質二重膜を形成が可能で、且つ、電気シグナル計測ができるガラスデバイスの開発に成功した。今後は、デバイス等のハードの面では、更なる歩留まりの向上やマルチアレイ化等の実用化が可能なデバイスや装置にブラッシュアップさせる必要がある。一方、脂質材料等のソフト面においては、センサとして使用する膜タンパク質あるいは解析する膜タンパク質により、デバイス側の脂質二重膜に使用する脂質や膜タンパク質を導入するリポソームを構成する脂質において、適切な脂質を選択する必要があり、それらの組み合わせや検討、実証などを重ね理論やノウハウの確立が必要と考える。ここまで実施すると、実用化に向けた具体的なアプリケーションが想定できる。例えば、創薬開発で重要になる膜タンパク質の解析は現状パッチクランプ装置を用いているが、生きた細胞を使用しているため、ハンドリングが容易でなく、また、スループットも悪く、雑多なタンパク質が含まれているため精度も良くない。しかし、本研究で開発した脂質二重膜デバイスを用いれば、所望の膜タンパク質の解析が効率良く、且つ、精度良く行うことができる。さらに、マルチアレイ化な

どスループットを向上することにより、創薬スクリーニングデバイスに発展できると考えられる。また、別の切り口として、ガンのマーカを高感度で検知できるデバイスへの応用も視野に入れている。本研究においては、血管内皮細胞増殖因子である VEGF と結合するペプチドを膜タンパク質（イオンチャネル KcsA）に結合させ、動作確認を実施した。VEGF 結合ペプチド配列を付加した KcsA 改変体を用いて、膜デバイスによる電流計測を実施し、KcsA 改変体のイオンチャネル活性としての電流シグナルの検出に成功した。今後の展開としては、溶液の置換が可能なマイクロ流路デバイスを用いて、KcsA 改変体と VEGF との結合に関する研究開発をさらに進めることをはじめ、多種多様なガンマーカータンパク質に視点を広げることで、ガンマーカの高感度検出システムの研究開発を行う。これにより、今まで世の中に無い、非常に高精度なガン検知センサデバイスの実現に寄与することが期待できる。

参考文献

- 1) Takeuchi et al, *Anal. Chem.* 2006
- 2) S.Ota, W.Tan, H.Suzuki, S.Takeuchi “MICROFLUIDIC FORMATION OF LIPID BILAYER ARRAY FOR MEMBRANE TRANSPORT ANALYSIS
- 3) Hirofumi Shimizu, Masayuki Iwamoto, Takashi Konno, Yuji C. Sasaki, Shigetoshi Oiki. “Global Twisting Motion of Single Molecular KcsA Potassium Channel upon Gating”, *Cell*, 132, 1, 67–78, (2008)
- 4) Kei Funakoshi, Hiroaki Suzuki, Shoji Takeuchi. “Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis”, *Anal. Chem.*, 78 8169-8174 (2006)

(2A) バイオ高次構造形成プロセス技術

(2A)-1 ハイドロゲルの高次構造形成プロセスの開発

(2A)-1-1 はじめに

糖尿病の患者は世界で3億6600万人いると言われており、その患者数は20年以内に5億5200万人に達すると考えられている¹⁾。糖尿病は、脳血管障害や網膜症、腎症、神経障害など合併症発症による体への負担が大きだけでなく、それらを治療するための医療費増大へとつながる。現在世界の糖尿病と合併症を合わせた医療費は4650億ドルと推定され多くの国や地域で脅威となっており、糖尿病を克服するための取り組みが世界中で展開されている²⁾。

糖尿病の進行を抑える上で大切なのは、血糖値を上手にコントロールすることである³⁾。一般に糖尿病患者は血糖値をコントロールするために一日に数回指から採血して血糖値を測定し、血糖値に応じてインスリンなどの血糖降下薬を自分で投与する。血糖コントロールは長期間継続することになるため、日々の血糖測定と投薬を低侵襲で安全に実施する方法が求められている。現在、インスリン投与に関しては経口薬や細い針を使った注射など低侵襲化技術の開発が進められているが、血糖測定時の痛みに対する低侵襲化はそれほど進んでおらず、患者にとっては大きな負担となっている。

現在最も一般的な血糖測定方法は、採血した血液をグルコースオキシダーゼ(GOD)やグルタミン酸デヒドロキナーゼ(GDH)といった酵素が塗られた試験紙上で反応させ、その結果を電気化学的もしくは発色反応として血糖測定器で読み取る(図①-(2A)-1.1)。この方法は測定精度も高く扱いやすいが、ある程度の採血量を確保する必要があり、採血時の痛みが大きな障害となる。

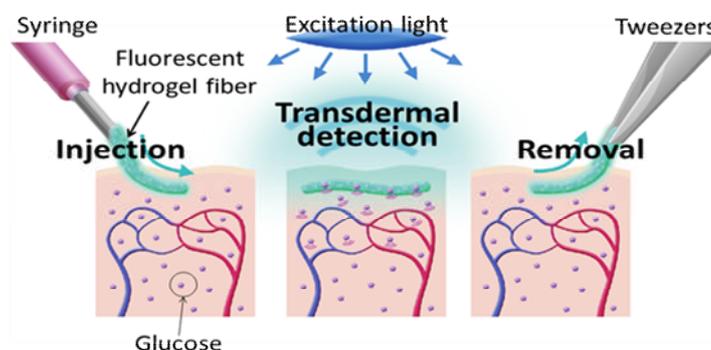


図①-(2A)-1.1 血糖測定器の例

さらに近年では、針状の体内留置部と体外装置接続部から構成される半埋め込み型酵素センサも開発され、連続血糖測定器による 24 時間連続血糖測定も可能になった (図①-(2A)-1.1)。日内血糖変動の治療応用や就寝時血糖の対応が可能になるだけでなく、インスリンポンプとの併用による治療への応用も期待されている。しかし、センサの寿命 (3 日程度) が短く、センサの校正に採血式の血糖測定が毎日数回必要となるため、使用者の負担は依然大きい。また、センサ挿入部からの感染という安全課題も存在する。

その他、近赤外光やラマン散乱などを応用した非侵襲な測定方法も提案されている⁴⁾⁶⁾。これらの測定方法は生体ノイズ (心拍、体温等) や個体差などが測定値に与える影響が大きく、前述の血糖測定器に代わって実用化へ至るまでにはまだ時間がかかるものと考えられる。

このような現状に対し、我々は完全埋め込み型血糖センサを提案し、低侵襲で安全な血糖センサを目指した糖応答性蛍光ゲルの研究を進めてきた (図①-(2A)-1.2)。これを実現するための要素研究として、最初の 3 年間は長期間の埋め込みを可能とするため、生体適合性の高い完全埋め込み型の血糖センサ開発に取り組んできた。ゲル表面を分子インプリンティング法やポリエチレングリコール (PEG) による表面修飾を検討し、最終的には PEG による修飾で埋め込み直後から発生する炎症反応の抑制に成功した。さらに、完全埋め込みを可能とするための形状も検討した。当初蛍光ゲルビーズを作製し、マウスの耳への埋め込み、糖負荷試験による糖応答能の確認に成功したが、ゲルが 1 ヶ月程度でかさぶたの形成とともに体外に排出されるなどしたため長期間の観察は困難であった。そこで、ファイバー型の蛍光ゲルを考案し、140 日間の埋め込み及び糖応答能の確認に成功した。以上のように、要素研究では当初目標としていた生体適合性の向上による長期埋め込み及び機能性の保持を達成することができた。



図①-(2A)-1.2 蛍光ゲルファイバコンセプト図

しかし、生体適合性を向上させ長期に埋め込めることを証明しただけでは、すぐに実用化することができない。血糖センサの目的は血糖を検知することであり、その能力を調べるのが必須となる。特に連続血糖測定用の血糖センサとして実用化するためには、測定精度や蛍光ゲルの劣化スピードといった蛍光ゲルの性質や蛍光検出デバイス、データ処理までを含めた測定システムの開発が欠かせない。実証研究では、上記要素研究で得られた血糖センサを元にこれら蛍光ゲルの性質調査と測定システムの構築に取り組んだ。

本報告では、血糖センサの血糖測定精度の検討、蛍光ゲルの劣化速度検討、ゲル表面へのナノパターン形成による早期炎症反応抑制効果の検討、連続血糖測定システムの構築の4つについて報告する。

血糖測定精度の検討では、短期間で数回の糖負荷試験を実施する必要があるため、動物をこれまでのマウスから、より体力のあるラットへと変更した。蛍光ゲルファイバーを埋め込んだ日を Day0 として Day14 まで、ラットの体調を見ながら蛍光実体県境を用いて麻酔下での糖負荷試験を実施した。得られた結果を適切なアルゴリズムで蛍光強度をグルコース値に変換し、その結果を自己血糖測定器 (SMBG) の血糖測定精度を示す指標として使用される Clarke's Error Grid Analysis (CEGA) に従って評価した。

蛍光ゲル劣化速度の検討では、蛍光ゲルの反応性を評価する必要があるため、グルコース濃度を自由に変化させると同時に温度を一定に保った溶液を循環し、長期間測定可能な装置を作製した。グルコース濃度を変化させると、蛍光強度が変動し、その変動幅を測定当初の変動幅と比較することで、蛍光ゲルの蛍光劣化と測定間隔の関係について調べた。

生体適合性のさらなる向上を目的としたゲル表面へのナノパターン形成では、ライン&スペースがエッチングされたシリコン基板上でゲルを作製し、なのパターンをゲル表面へ転写した。これをラットの背中に埋めて炎症反応の大きさを評価した。炎症反応の大きさは、マクロファージなど炎症関連細胞の数や繊維化した組織の厚さを比較することで評価した。

連続測定システムの構築は、蛍光検出装置の開発とデータ処理システムの開発の二つを行った。蛍光検出装置の開発では、LED と PD を搭載し、ラットの耳へ装着可能なシンプルかつ小型の装置を目指した。装置の機能確認は麻酔下のラットを使って糖負荷試験を実施し、尻尾から採血した血液により測定される血糖値の変動と蛍光強度の変動が同様の挙動を示すかどうか調べた。また、装置の無線化を進め、前述の蛍光検出装置を用いた覚醒下ラットの測定を実現できた。

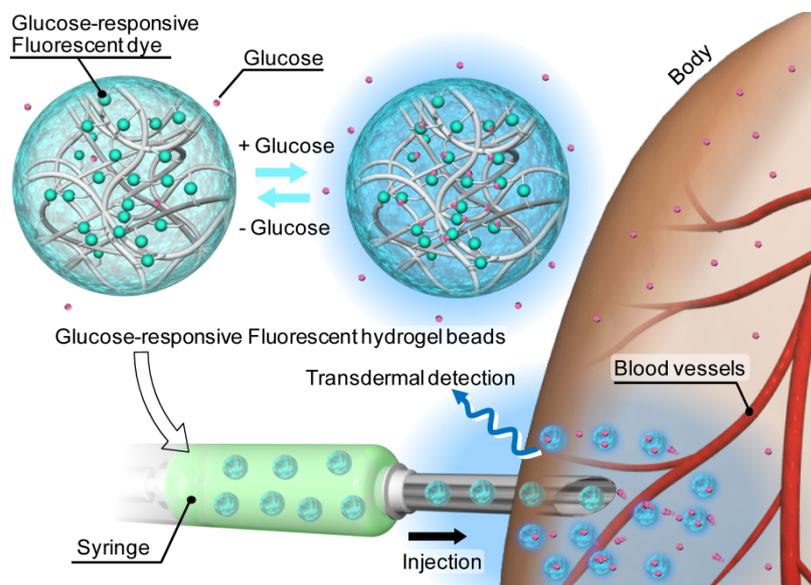
(2A)-1-2 要素研究の概要

(2A)-1-2-1 中間目標

電子線重合法等による分子インプリンティング界面形成や、生体適合性ポリマー分子の表面修飾等の検討結果から、長期に埋め込み可能な生体適合性界面形成のための材料や手法を選定する。これを糖応答性蛍光ゲルに応用し、マウスへの埋め込み実験により、埋め込み場所として適当な部位（腎被膜下、耳、皮下など）の検討、有効性を実証する。

(2A)-1-2-2 完全埋め込みのための形状作製

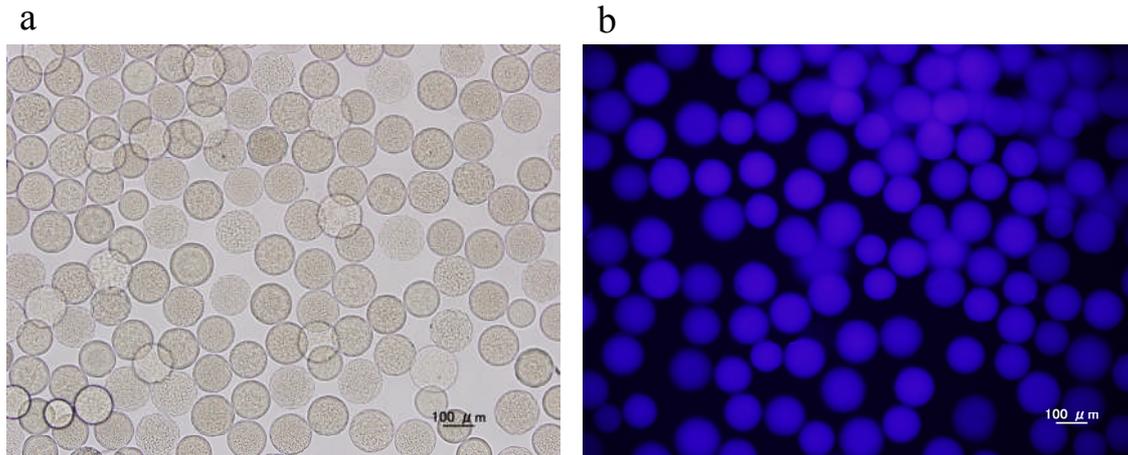
第一の要素研究として、低襲侵での完全埋め込みのため、周囲の糖濃度に応じた蛍光を発するゲルをマイクロサイズのビーズ形状で作製するプロセスの開発を試みた。糖濃度応答性蛍光ゲルをマイクロサイズのビーズ形状にすることができれば、注射により生体に埋め込むことが可能であり、埋め込んだビーズの蛍光を生体外から観察することで、血糖値を光学的手法で痛みなくモニタリングすることが可能となる。また、生体への針刺しは埋め込み時のみのため、感染リスクも最小限に抑えることが可能となる。本検討のコンセプトを図①-(2A)-1.3 に示す。



図①-(2A)-1.3 本研究のコンセプト

蛍光ゲルビーズは3次元マイクロ流路(3D-AFFD法)により作製した。作製においては、内層溶液の組成を15wt% AAm, 0.3wt% Bis-AAm, 0.09wt% SPS、外層溶液を窒素置換したシリコンオイルとし、それぞれの流速を10 μ L/min、150 μ L/minと

した。これにより得られた液滴を、TEMED 濃度 0.05wt%、37°C、窒素バブリング下のシリコンオイル中に分取し、蛍光ゲルビーズを合成した。得られた蛍光ゲルビーズをヘキサン、エタノール、milliQ、60mM リン酸バッファで洗浄し、水溶液中に蛍光ゲルビーズを取り出した。得られたゲルビーズの顕微鏡観察像を図①-(2A)-1.4 に示す。



図①-(2A)-1.4 作製した蛍光ゲルビーズ、(a)明視野像、(b)蛍光像

図①-(2A)-1.4 から確認できるように、蛍光ゲルビーズは凝集することなく、水溶液中にて分散していることが確認できた。また、蛍光像から、本作製方法にて、グルコース応答性蛍光色素がゲルビーズ中に固定されていることが確認された。

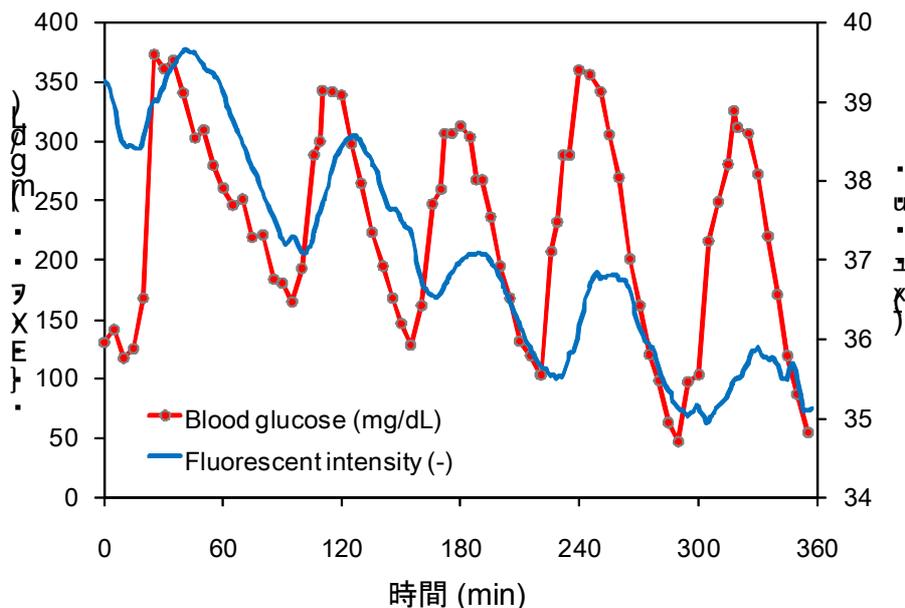
また、顕微鏡像の解析より平均粒径 130.1 μm 、分散値を示す CV(標準偏差/平均粒径)が 10.1%と求まった。懸濁重合法では一般的に、CV 値が 20%を超えるため、本実験条件より、粒径分布の狭い蛍光ゲルビーズを作製することが可能であることが実証された。



図①-(2A)-1.5 右耳に蛍光ゲルビーズが埋め込まれたマウス

次に、高濃度の糖溶液とともに、蛍光ゲルビーズを注射によりマウス耳皮下に埋め込み、励起光を照射したところ、皮下の蛍光ゲルビーズの蛍光を確認することができた(図①-(2A)-1.5)。注射針を用いて埋め込み可能なため低襲侵と言える。

次に、耳に蛍光ゲルビーズを埋め込んだマウスの血糖値を変化させたときの、蛍光ゲルビーズの蛍光強度変化の観察結果を図①-(2A)-1.6 に示す。



図①-(2A)-1.6 糖負荷試験時のマウスの血糖値と蛍光強度の変化

今回の糖負荷試験においては、迅速な血糖値変化を起こすために、頸静脈に直接、グルコース溶液とインスリン溶液を投与できる系を設定した。これにより、6時間の間に計5回の血糖値の上昇下降を起こすことに成功した。これと同時に、マウス耳に埋め込んだ蛍光ゲルの蛍光強度も血糖値変化を追従するような形で、上昇下降を繰り返した。このときの蛍光強度は、血糖値に比べておおよそ5~15分遅れて変化していた。蛍光ゲルは血液と触れる部位ではない、皮下に埋め込まれているため、血液から求められる血糖値の変化と比べて、変化が遅れるのは妥当である。

一方で、蛍光ゲルの蛍光強度が、時間経過とともに減少していく傾向が見られた。これはおそらく退色によるものであり、実際に、一定濃度の糖液中の蛍光ゲルの蛍光強度が *in vitro* において、励起光照射時間が減少していく様子が確認できている。

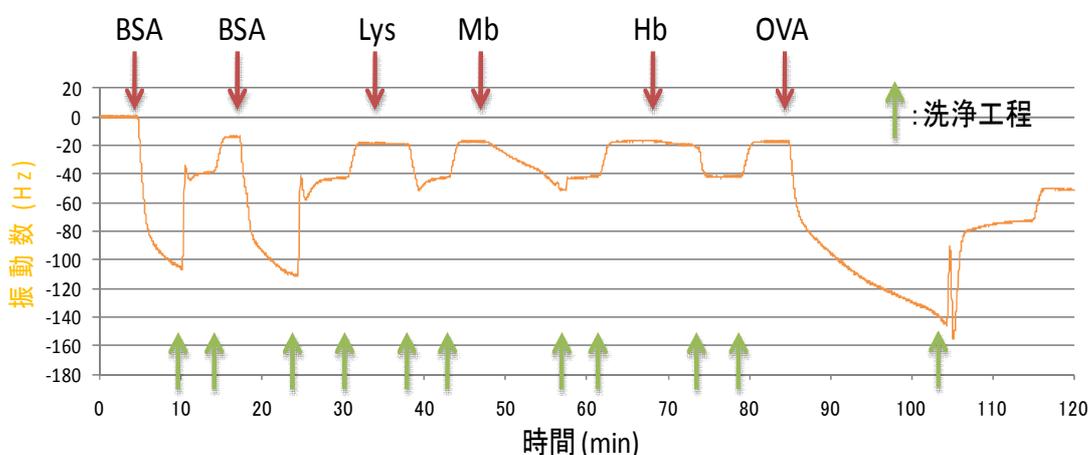
(2A)-1-2-3 生体適合性界面の作製検討

a. 分子インプリンティングによる生体適合性界面の作製検討

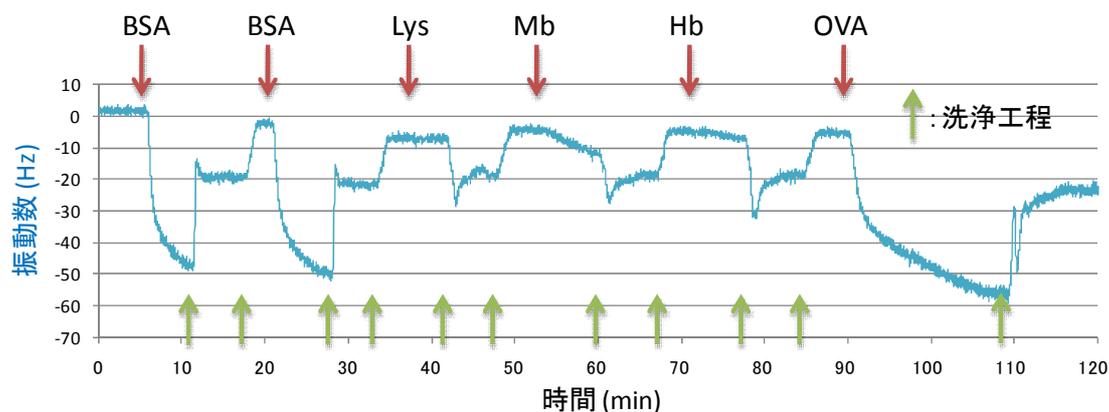
体内に入った異物表面には、まずタンパク質が吸着する。このとき吸着したタンパク質は変性状態となっており、これが異物認識の最初のシグナルとなり、炎症反応が開始される。そのため変性状態ではなく天然状態で吸着させることができれば、炎症反応の開始を抑制させることができると考えられる。ここでは天然状態でタンパク質を吸着させる方法として、分子インプリンティング(MIP: Molecular Imprinted Polymer)ゲルの作製を試みた。

MIPゲルを作製するにあたり必要なものは、ゲルの基本骨格となる化合物、架橋剤、MIPの対象となる化合物(テンプレート)に加え、テンプレートと結合する機能性モノマーである。本検討では生体内において最も多く存在しているタンパク質であるアルブミンをテンプレートとした。それに対し、ウシ血清アルブミン(BSA)のMIPを行っている先行研究を参考に、*N*-[3-(Dimethylamino)propyl]-methacrylamide (DMAPMA)を機能性モノマーとしてMIPゲルの作製を行った。ゲルは電子線重合により作製した。DMAPMAは疎水性で正電荷を有する分子であり、1分子中に18の負電荷を有するアルブミンと結合する。

作製したゲルのMIP能は、微小な質量変化をモニタリング可能なQCM(分子間相互作用測定システム)を用いて評価した。まず、アルブミンMIPゲル、及び、アルブミンのNIP(Non-Imprinted Polymer)ゲルに対する各種タンパク質の吸着量評価結果を図①-(2A)-1.7、図①-(2A)-1.8に示す。



図①-(2A)-1.7 アルブミン NIP ゲルに対する各タンパク質の吸着測定結果



図①-(2A)-1.8 アルブミン MIP ゲルに対する各タンパク質の吸着測定結果

BSA(Bovine Serum Albumin) : Mw=66kDa, pI 4.8

OVA(Ovalbumin) : Mw=44kDa, pI 4.7

Hb(Hemoglobin) : Mw=64.5kDa, pI 6.8~7.0

Lys(Lysozyme) : Mw=14.4kDa, pI 10.7

Mb(Myoglobin) : Mw=17.5kDa, pI 6.8-7.2

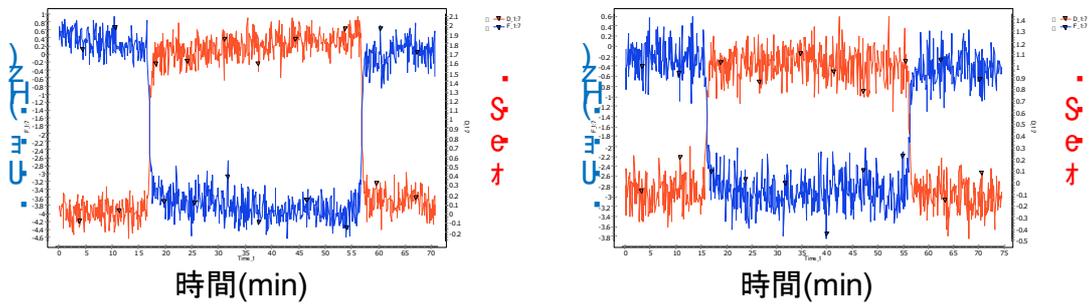
まず NIP ゲルについて確認すると、各タンパク質で振動数変化が異なっていた。これは、DMPMA とタンパク質との結合しやすさの差に起因するものであるため、正電荷が高いタンパク質ほど、吸着量が大きくなる。MIP ゲルに期待されるのは、組成上は同じゲルであるにも関わらず、BSA の立体構造をインプリントしたことで、BSA に対する吸着能のみが、NIP ゲルの結果と比較して特異的に向上することである。

しかし、MIP ゲルの評価の結果からは、NIP ゲルと同様の変化がみられたのみであり、MIP 能を確認することはできなかった。原因としてゲル作製時にそもそも BSA と DMPMA が結合していない、もしくは、重合後の洗浄工程の際にゲルが膨張収縮を繰り返すため、これによりゲルの立体構造が失われている可能性が考えられる。

b. ポリマーブラシ導入による生体適合性界面の作製検討

次に、ゲル表面へのたんぱく質吸着の抑制のため、ポリマーブラシとして、ポリエチレングリコール(PEG)を蛍光ゲル中に導入した。5wt% の PEG-DA を組成にもつ PEG 蛍光ゲルと、コントロールとして PEG を含まない蛍光ゲルを作製し、500mg/mL の高濃度 BSA を流したときのゲルへの吸着を QCM にて評

価した結果を図①-(2A)-1.9 に示す。



図①-(2A)-1.9 蛍光ゲルへのタンパク質吸着測定結果

結果、BSA は高濃度にも関わらず、PEG あり、なしどちらにおいても、ほとんど吸着が見られなかった。わずかな振動数の変化は、溶液中の BSA の濃度増加分によるものである。このことから、PEG の導入の有無に関わらず、蛍光ゲルは高い BSA 吸着抑制能を有していることが確認できた。しかし、これは 30 分程度の短時間のものであり、生体への埋め込みのためには、より長期間の評価が必要である。そこで、PEG 蛍光ゲルを低侵襲で埋め込み可能なファイバー形状にて作製し、これをマウスに埋め込み、耳の腫れの経過と蛍光強度の変化を 1 日 1 回のペースで観察した。

PEG 蛍光ゲルファイバーと蛍光ゲルファイバー(PEG なし)のサンプルを、各 4 匹のマウス耳に埋め込み、耳の炎症を、発赤、腫脹・浮腫、痂皮の 3 項目について、なし 0 点、軽度 1 点、重度 2 点で点数付けしてモニターした。以下に点数付けの例を図①-(2A)-1.10 に示す。



図①-(2A)-1.10 マウス耳の腫れの点数付けの例

次に作製した PEG 蛍光ゲルファイバーの外観とそれを右耳に埋め込んだマウスの写真を図①-(2A)-1.11 に示す。ゲルファイバーはゲルビーズ同様、注射針で低襲侵に埋め込むことが可能であった。また、ファイバーの一端をつまむことで、埋め込んだゲルを体外に取り出すことが可能であった。ゲルビーズでは埋め込み後の回収は困難であり、取り出し可能である点はファイバー形状で作製するメリットの1つである。

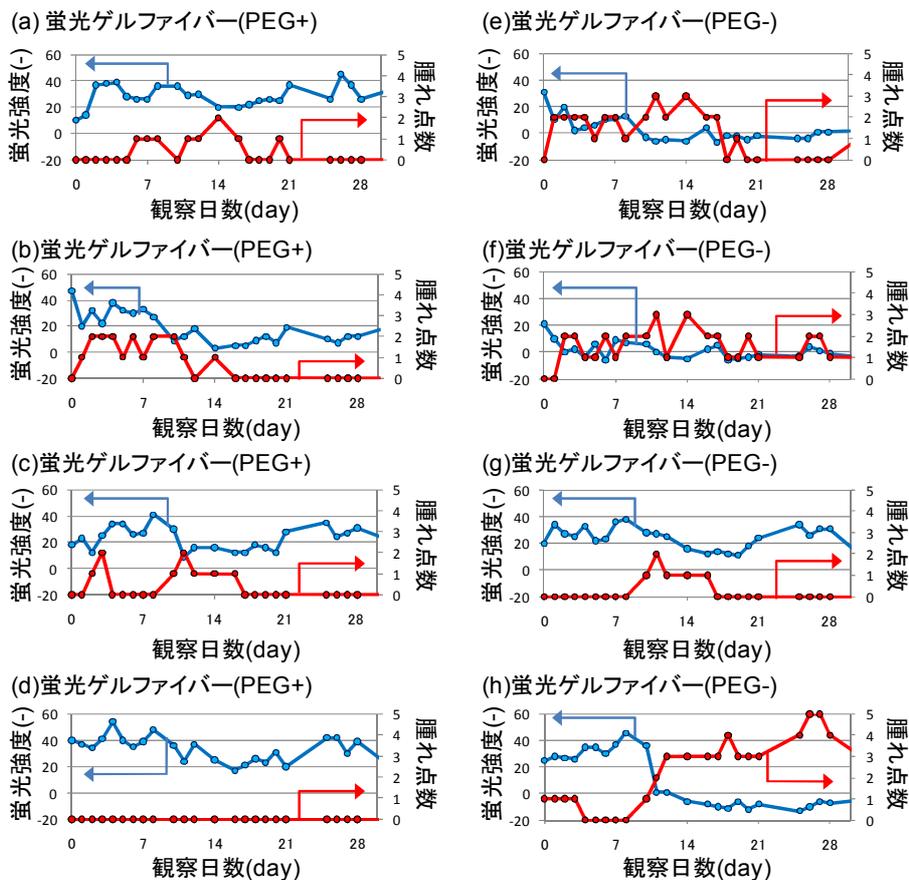
(a) 蛍光ゲルファイバー



(b) 蛍光ゲルファイバーを埋め込んだマウス

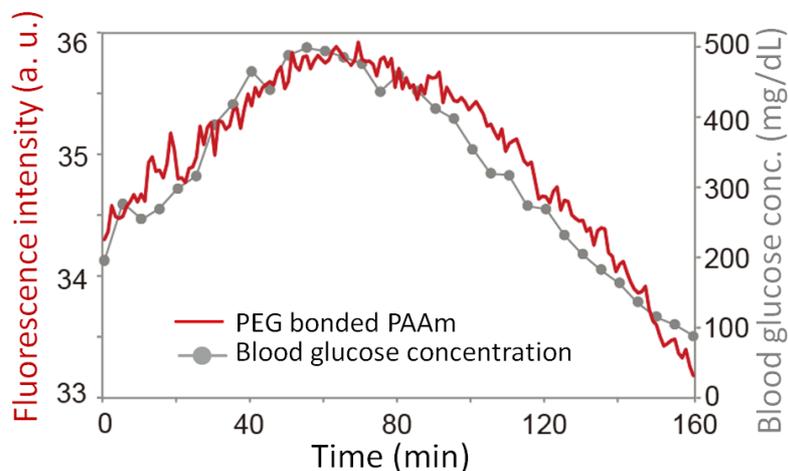
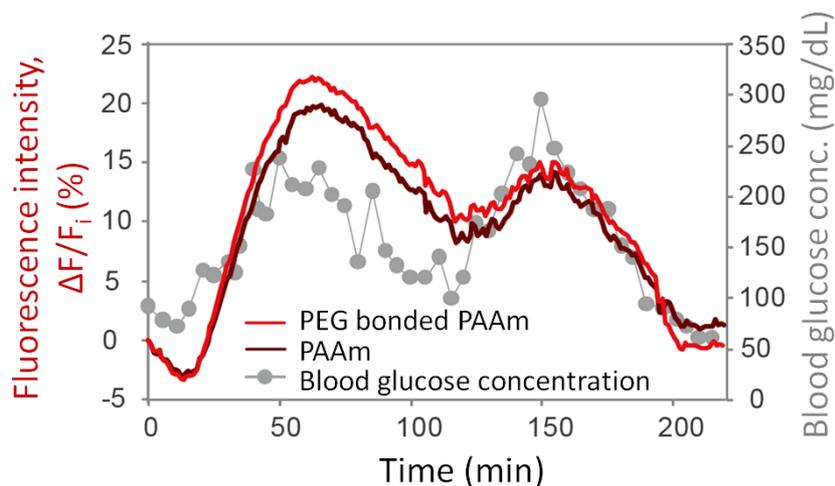


図①-(2A)-1.11 作製した蛍光ゲルファイバーとそれを耳に埋め込んだマウス



図①-(2A)-1.12 蛍光ゲル埋め込みマウス耳の腫れと蛍光強度の長期観察結果

次に、蛍光ゲルファイバーが埋め込まれたマウス耳の腫れの様子と、蛍光ゲルファイバーの蛍光を 30 日間、観察した結果を図①-(2A)-1.12 に示す。図①-(2A)-1.12 の腫れ観察結果より、PEG 蛍光ゲルファイバーを埋め込んだマウスのほうが、PEG なしのものに比べて、腫れの度合いが小さいことが確認できる。また、それと対応するように、腫れの少ない PEG 蛍光ゲルファイバーのほうが強い蛍光強度が得られることが確認できた。また、31 日経過時点で蛍光強度が 0 付近まで低下しているのは、(e), (f), (h)のマウスであり、これら全てから 3 点以上の腫れが観察されている。一方、蛍光強度が比較的保たれているものについては、3 点以上の腫れが観察されたものはない。このことから、腫れ点数が 3 点を超えるかどうか、1 ヶ月間の蛍光強度を保てるかどうかの目安になると考えられる。



図①-(2A)-1.13 糖負荷試験結果 (a)埋め込み直後 (b)埋め込みから 140 日後

次に蛍光ゲルファイバーを埋め込んだマウスに対して、埋め込み直後（3時間）と埋め込みから140日後に糖負荷試験を実施し、蛍光ゲルの機能性を確認した（図①-(2A)-1.13）。140日後では基本的な蛍光強度の値は落ちているが、血糖変動に対する蛍光値の追従性は埋め込み直後と変わらないほど保たれていた。なお、PEGの無い蛍光ゲルは140日目までに体外へ排出されてしまうなどして残っていなかったため糖負荷試験は実施していない。

これらの結果から、PEGを蛍光ゲルに導入することで、マウスに埋め込んだときの炎症反応を抑え、埋め込み後から140日経過後においても糖応答能が確認可能な生体適合性界面を形成可能であることがわかった。

(2A)-1-3 実証/基盤技術研究

(2A)-1-3-1 最終目標

ビーズ形状やファイバー形状などの高次構造ゲルを作製し、マウスやラットに埋め込んだ評価を行い、これを測定するための装置試作と、3ヵ月連続して機能するハイドロゲルの作製プロセスを決定する

(2A)-1-3-2 実施内容

要素研究にて生体適合性が高く、3ヵ月間以上機能する蛍光ゲルの開発に成功した。実証研究では、得られた蛍光ゲルファイバーを基に、さらなる生体適合性向上、蛍光ゲルの特性評価及びこれを測定するための装置を試作し、基本性能の向上を目指すとともに実用化で場合に必要とされる課題についての検討を行った。具体的には、*in vivo* 実験におけるナノパターン表面の生体適合性評価、*in vitro* 実験におけるグルコース濃度と蛍光強度の関係を用いた測定精度の検討、蛍光劣化の評価、検出装置の開発及び無線システムの構築である。

a. ナノパターン表面を有するゲルの生体適合性評価

創傷や異物が侵入して来た場合、当該部位の周辺ではそれらの事象に対処するため炎症反応が起こる。炎症反応は主にマクロファージやリンパ球などによって引き起こされ、炎症性サイトカインなどの情報伝達物質の放出や、死細胞の除去などを行う。炎症反応は、創傷部位の治癒や異物を出して正常な状態を保つために必要な反応であり、全て抑えることはできない。しかし、異物が常に周囲の細胞へ刺激を与えてしまう場合や、創傷部位に感染してしまった場合など、この反応が長く続き慢性化してしまうことがある。炎症が慢性化すると、

その部分が赤く腫れて痛みを伴うことがあるため早期に炎症を抑える必要がある。

本項目で検討を進めるナノパターンについては、近年細胞の接着性を制御できるとの報告がある。炎症は、炎症性細胞が異物の周辺に集合するところから始まる。よって、ナノパターンを有するハイドロゲルにより、マクロファージやリンパ球といった炎症細胞が異物として挿入されたハイドロゲルの周りに接着するのを防ぐことができれば、抗炎症手段となる可能性がある。要素研究にて PEG を導入することで生体適合性の向上に成功したが、さらにナノパターンで表面形状を操作して生体適合性を向上させることができれば、化学的、機械的両側面からの相乗効果が期待できる。

このナノパターン表面の効果を検証するため、サイズの検討を実施しやすい Line and Space (L&S) パターンでサイズの異なった表面を有するハイドロゲルを作製した(図①-(2A)-1.15表①-(2A)-1.1)。これらをラットの背中に埋め込み、21 日後に埋め込んだ周辺組織の切片標本を作製し、観察した。炎症の評価では、埋め込んだハイドロゲル周辺組織の被包厚を測定した。被包厚は初期からの炎症強度を反映するため、炎症がひどい場合は厚くなる。

ア. 実験方法

<ナノパターン表面ハイドロゲル作製方法>

[実験器具・装置]

L&S シリコン基板、PET フィルム、ソフトシリコンフィルム (1mm)、分銅 (15g)

[試薬類]

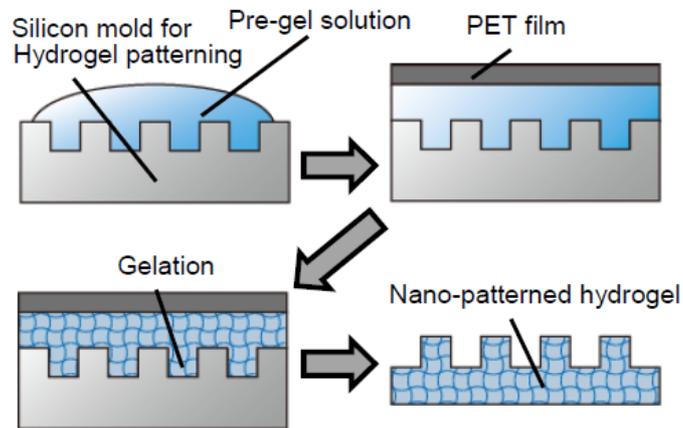
アクリルアミド(AAm) 15wt%、*N,N'*-メチレンビスアクリルアミド(Bis-AAm) 0.3wt%、過硫酸ナトリウム(SPS) 0.36wt%、*N,N,N',N'*-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED) 0.2wt%

[作製手順]

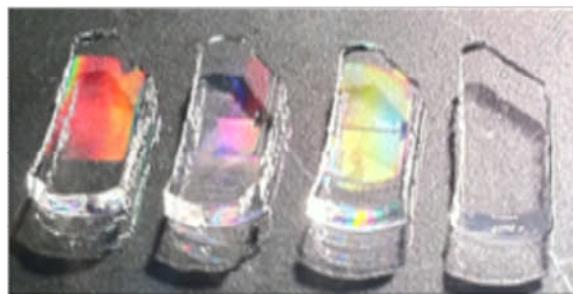
1. シリコン基板を 30 分 UV オゾン洗浄し、基板表面を親水性にした。
2. アクリルアミドゲル溶液を用意し、シリコン基板のパターン側に滴下した。
3. PET フィルムを乗せ、分銅で上から抑えた。
4. 5~10 分ほど室温で放置後、mili-Q 水で浸して振とう台上に 1~2 日程度放置した。

5. シリコン基板と PET フィルムから、ハイドロゲルが剥がれるので、回収した。

図①-(2A)-1.14 に作成手順の図を示す。



図①-(2A)-1.14 ナノパターン表面ハイドロゲル作製手順

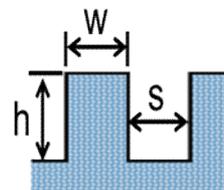


図①-(2A)-1.15 作製したナノパターン表面ハイドロゲル

表①-(2A)-1.1 L & S サンプル (A, B, C) のサイズ詳細

Hydrogel Sample	w	s	h
A	300	600	600
B	500	5200	2500
C	1000	6500	3000

(nm)



<ラットへの埋め込みによる被包厚評価>

ラットは体毛で覆われているため、そのまま手術をすると体毛の混入による感染の恐れがある。そこで、前処理としてハイドロゲル埋め込みの三日前に除毛処理を行った。埋め込みでは、1匹のラットに対して、用意した4つのサン

プルをそれぞれ違う場所に埋め込んだ。組織の取り出しは、初期の炎症反応が抑えられ、被包がしっかりと確認される 21 日後とした。

(埋め込み前処理)

[実験器具・装置]

動物用バリカン、お湯

[試薬類]

イソフルラン、除毛クリーム、チンク油（またはオリーブ油）

[実験手順]

1. ラット（8 週齢）をイソフルラン吸入麻酔で眠らせた。
2. バリカンを使って背中の中身の体毛を剃った。
3. 除毛クリームを 2. の剃毛部に塗り、10～20 分程度放置した。
4. 除毛クリームを拭き取り、お湯で除毛クリームを洗い流した（図①-(2A)-1.16）。
5. 全身をキムタオルで拭いた後、チンク油（もしくはオリーブ油）を除毛部に塗り、除毛部を保護した。



図①-(2A)-1.16 除毛後のラット

(埋め込み手順)

[実験器具・装置]

サーモプレート、手術器具、縫い糸針

[試薬類]

イソフルラン、イソジンゲル、ボスミン（100倍希釈）

[実験手順]

1. ラット（剃毛済み）をイソフルラン吸入麻酔で眠らせた。
2. ラットの背中にイソジンを塗り消毒した。
3. 埋め込み場所に先が鋭利なハサミで切りこみを入れた。
4. 先が鈍のハサミを使い、ゲルを埋め込むためのポケットを作った。
※出血が激しい場合は、ボスミンを滴下した。
5. パターンが背中の皮側を向くようにして、ポケットの中にゲルを置いた。
6. 切り口を縫い、イソジンゲルを縫い目に塗ってから麻酔から覚ました。
※埋め込み後のラットを図①-(2A)-1.17に示す。



図①-(2A)-1.17 ハイドロゲル埋め込み後のラット

(切片作製方法)

[実験器具・装置]

手術器具

[試薬類]

ホルマリン中性緩衝液 10%

[実験手順]

1. ラットを所定の安楽死法に従って、安楽死させた。
2. 埋め込まれたゲルを切らないようにして皮だけを剥いだ。
3. 剥いだ皮をホルマリンに浸けて3日放置した。こうすることで、組織と

ゲルが離れづらくなる。

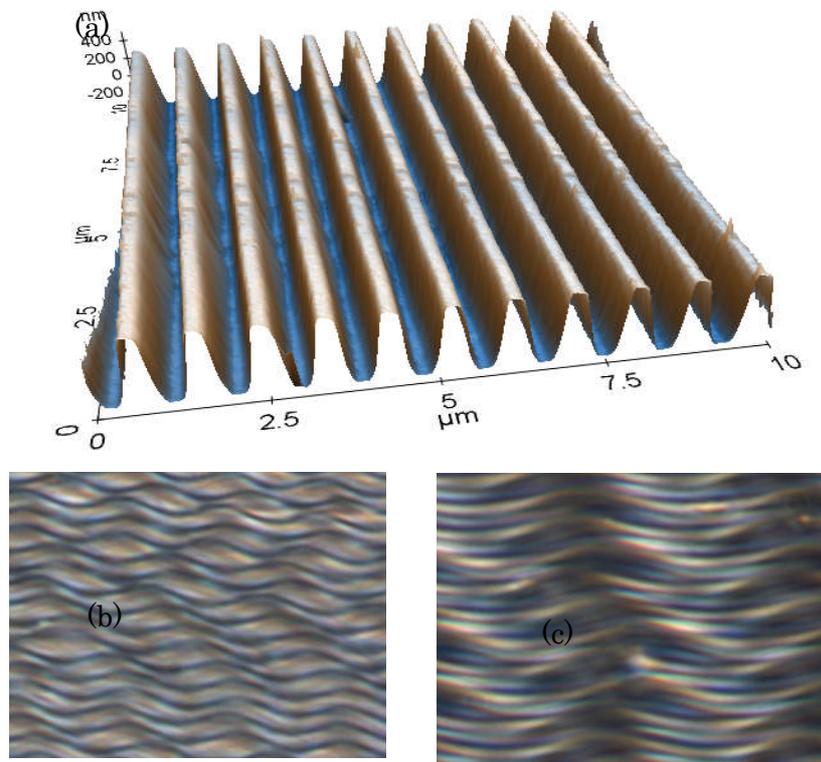
4. ホルマリン浸漬後、ゲルと周辺の組織を約 2cm 角に切って小瓶に入れる。
5. HE 染色は業者に依頼した。

イ. 結果・考察

＜水中でのナノパターン形成確認＞

ハイドロゲルは水中で膨張するため、実際に埋め込まれたゲルがどのような形状をしているかは、水中で調べる必要がある。本研究では、パークシステムズ社に依頼し、水中でも測定できる AFM (XE-100) を使用し、サンプル A、B、C の形状測定を試みた。

サンプル A を測定した結果を図①-(2A)-1.18(a)に示す。AFM にて測定された形状は表①-(2A)-1.1 の数値と一致しており、ナノパターンの転写が成功していることがわかった。



図①-(2A)-1.18 ナノパターンゲルの形状測定 (a)サンプル A の AFM 画像(b)サンプル B の顕微鏡画像 (c)サンプル C の顕微鏡画像

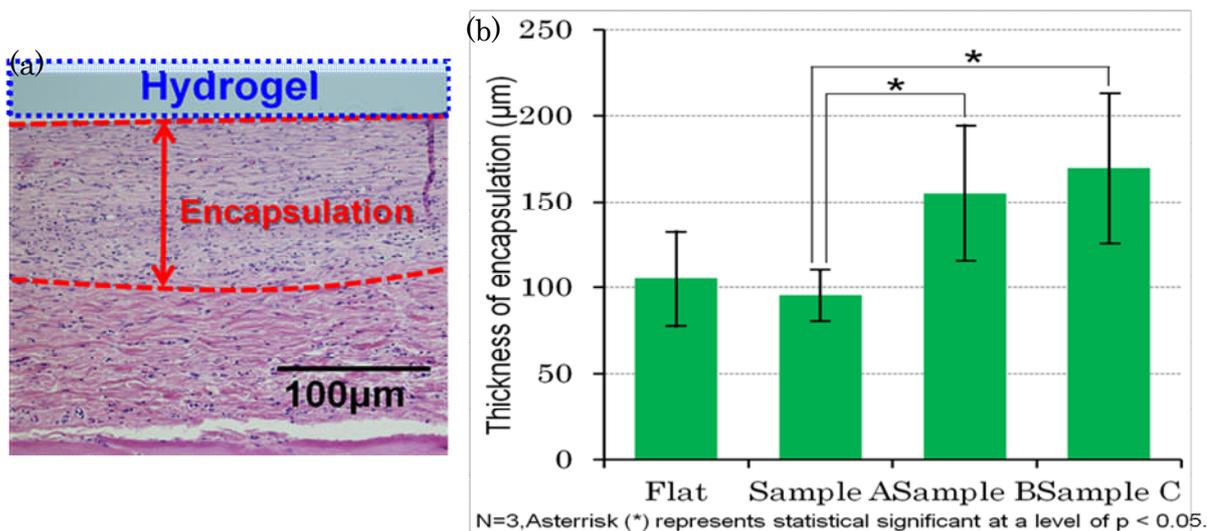
サンプル B,C に関しては、ハイドロゲルが柔らか過ぎてカンチレバーがゲル

に食い込んでしまい測定することができなかった。サンプル B,C はアスペクト比が大きく、カンチレバーが当たると柔らかくて動いてしまうことが原因と考えられる。また、顕微鏡で確認したところ水中では膨張したハイドロゲルの波模様が観察でき、ゲルが膨張してしまい L&S 形状が保たれていないことがわかった。

<被包厚評価>

ナノパターン表面を有するハイドロゲルの生体適合性を評価するため、ラットに埋め込んだハイドロゲル周辺の炎症状態について、被包の厚さを評価した(図①-(2A)-1.19a)。被包部位は、正常な部位と比較して細胞の形状が異なり、層を形成している。それぞれのサンプルを埋め込んだ部分の被包厚について、上記被包の厚さを数値化した結果を図①-(2A)-1.19b に示す。

パターンのないフラットサンプルとナノパターンとの比較では、有意な差がなかった。サンプル A の平均値はフラットサンプルよりも若干小さい数値となっているが、その差は 10 μm 程度であり、ナノパターンにより被包が薄くなる傾向があるともいえない。つまり、細胞にとってはフラットとナノパターンの区別がほとんどなく、どちらも同じような表面として認識されていた可能性が高い。



図①-(2A)-1.19 切片観察 (a)切片画像：赤点線で囲まれた部分が被包む,サンプルごとの被包厚比較

一方、サンプル A (ナノパターン) の被包厚は、サンプル B、C (ライン間
が広いサンプル) に比べて有意に薄かった。形状でも示したように、サンプル
B,C は柔らかいひだのようなものが表面上に形成されていたためそれらが慢性
的に埋め込み部位を刺激し、被包の形成を促進したことが予想される。また、
柔らかいため他の細胞が入りやすく、返って接着するための足場を提供してし
まったと考えられる。今回検討した形状では、炎症反応を抑えることはできな
かったが、表面にパターンを形成することで炎症反応に何らかの影響を与える
ことは示すことができた。少なくとも今後、このような炎症を助長する表面を
避ける必要はあるだろう。

b. 蛍光ゲルファイバー蛍光強度の定量化と機能性評価

蛍光ゲルファイバーは、以下に示す手順で作製した。作製した蛍光ゲルファ
イバーは、14G の留置針を使ってラットの右耳に埋め込み、腹腔からの糖負荷
試験を行った。糖負荷試験は埋め込み直後から行い、埋め込み後 14 日目まで
ラットの状態を見ながら実施した。さらに、得られた蛍光強度が実際の血糖値
を反映したものであることを確かめるため、取得データのキャリブレーション
を行い、Clarke's Error Grid Analysis による推定精度の評価を行った。

ア. 実験方法

<蛍光ゲルファイバーの作製方法>

[実験器具・装置]

留置針 (14G)、シリンジ (1ml)、サーモプレート、電子天秤

[試薬類]

アクリルアミド(AAm) 15wt%、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(Bis-AAm)
0.3wt%、過硫酸ナトリウム(SPS) 0.18wt%、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジ
アミン(TEMED) 0.2wt%、ポリエチレングリコール (PEG) 5wt%、S41 10wt%

[作製手順]

1. S41 を必要な量だけ電子天秤で量り、マイクロチューブに入れた。
2. 1 のマイクロチューブに AAm、Bis-AAm 溶液、PEG を入れて混和した。
3. SPS、TEMED の順に 2. の溶液に加えた。TEMED を加えた後はすぐに
ゲル化するので素早く次の操作に移った。
4. 留置針の外套にシリンジを装着し、3. の溶液が外套内が満たされるま
で吸い上げた。

5. ゲル溶液が満たされた外套を 36°C に設定したサーモプレートの上に 30 分放置した。
6. ゲル化後、シリンジで外套からゲルを押し出し、2 日間 mili-Q 水の中で振とうさせた。

< 腹腔内からの糖負荷試験 >

[実験器具・装置]

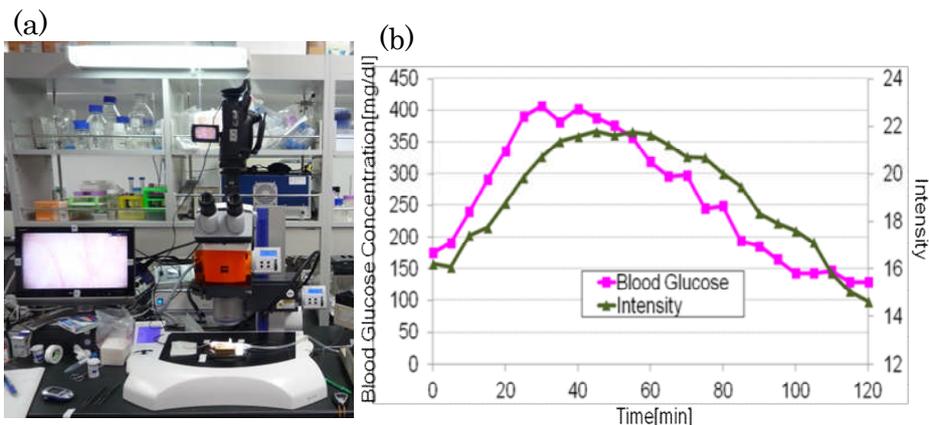
蛍光実体顕微鏡、P C (M A T L A B)、ビデオカメラ、血糖測定機 (accucheck)

[試薬類]

50% グルコース溶液、0.25% インスリン溶液

[実験手順]

1. ラットをイソフルラン吸引麻酔で眠らせた。
2. 血糖測定機で五分毎に血糖値を測定すると同時に、1 分ごとに蛍光画像を取得した。取得した画像は MATLAB でリアルタイム解析を行い、ディスプレイ上に計算された蛍光強度をプロットした (図①-(2A)-1.20)。
3. 測定開始から 10 分以降で測定値が一定になったら、グルコース溶液 (0.5 ~ 2ml) を腹腔内に打った。
4. 血糖値上昇後、値がプラトーになった時点でインスリン溶液 (0.5ml 以下) を腹腔内に打った。
5. 血糖値が下がり、ほぼ一定になったところで実験を終了した。



図①-(2A)-1.20 糖負荷試験セットアップ (a) 実験装置、(b)血糖値と蛍光強度変化

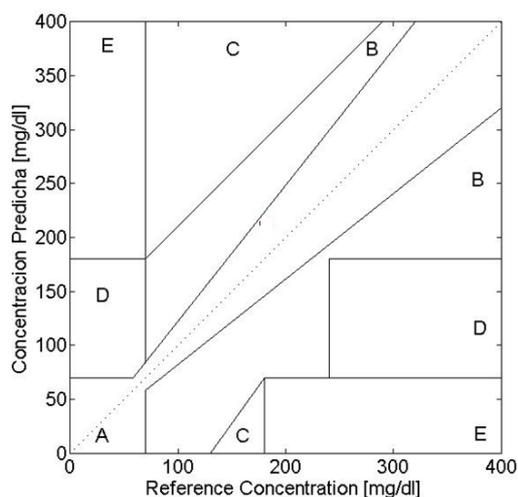
<定量化方法と精度評価>

(時間遅れの補正方法・検量線)

血糖値の変化に対して、蛍光強度が変化するまでには約 10 分程度の時間遅れが存在する。蛍光ゲルファイバーは組織の間に空間を作り、その空間に埋め込まれているため、血管内のグルコースが蛍光ゲルファイバーの周辺に浸透してくるまで時間がかかる。よって、蛍光強度の値はこの浸透にかかる時間の分だけ実際の血糖値よりも遅れてしまう。この時間遅れを補正するために、蛍光強度のデータを実際の血糖測定で得られたデータに対して 5 分毎ずらし、それぞれのずらしたデータにおける蛍光強度と血糖値の相関係数を計算した。両者の変動の様子がほぼ一致する場合、相関係数が最大になる。本研究では 10 分とした。その後、時間遅れを補正したデータに対して、30 分毎 4 点を使って近似直線を作製し、検量線を作製した。各糖負荷試験で実験条件や蛍光ゲルの観察範囲などが変わるため、得られた検量線は実験ごとにばらつきがあった。そのため、実験ごとに検量線を作製し、それぞれの推定血糖値を計算した。

(Clarke's Error Grid Analysis)

上記検量線により算出された値の推定精度について、Clarke's Error Grid Analysis (CEGA) に従って評価を行った。図①-(2A)-1.21 に評価に使う領域を示す。



図①-(2A)-1.21 Clarke's Error Grid Analysis

CEGA では、0~400mg/dl までの血糖値について、横軸血糖値、縦軸推定血糖値としてプロットし、プロットが A~E までのどの領域に存在するかによってセンサの精度を評価する。A領域は血糖値と推定血糖値のズレが±20%の領域であり、一般的な観血式血糖計では測定データの 80%以上がこの領域に存在する。B領域は値のズレが±20%以上であるが、臨床的に大事故にはつながらない程度の領域である。C~E 領域にプロットされるデータは臨床的に危険なエラーであるため、1つでもあってはならない。

イ. 結果・考察

蛍光ゲルファイバー埋め込み後の糖濃度応答性を検証するため、埋め込み直後から 14 日目まで、図①-(2A)-1.22 に示すスケジュールで麻酔下のラットに対し糖負荷試験を実施した。

Day0	Day1	Day2	…	Day4	…	Day7	…	Day14
------	------	------	---	------	---	------	---	-------

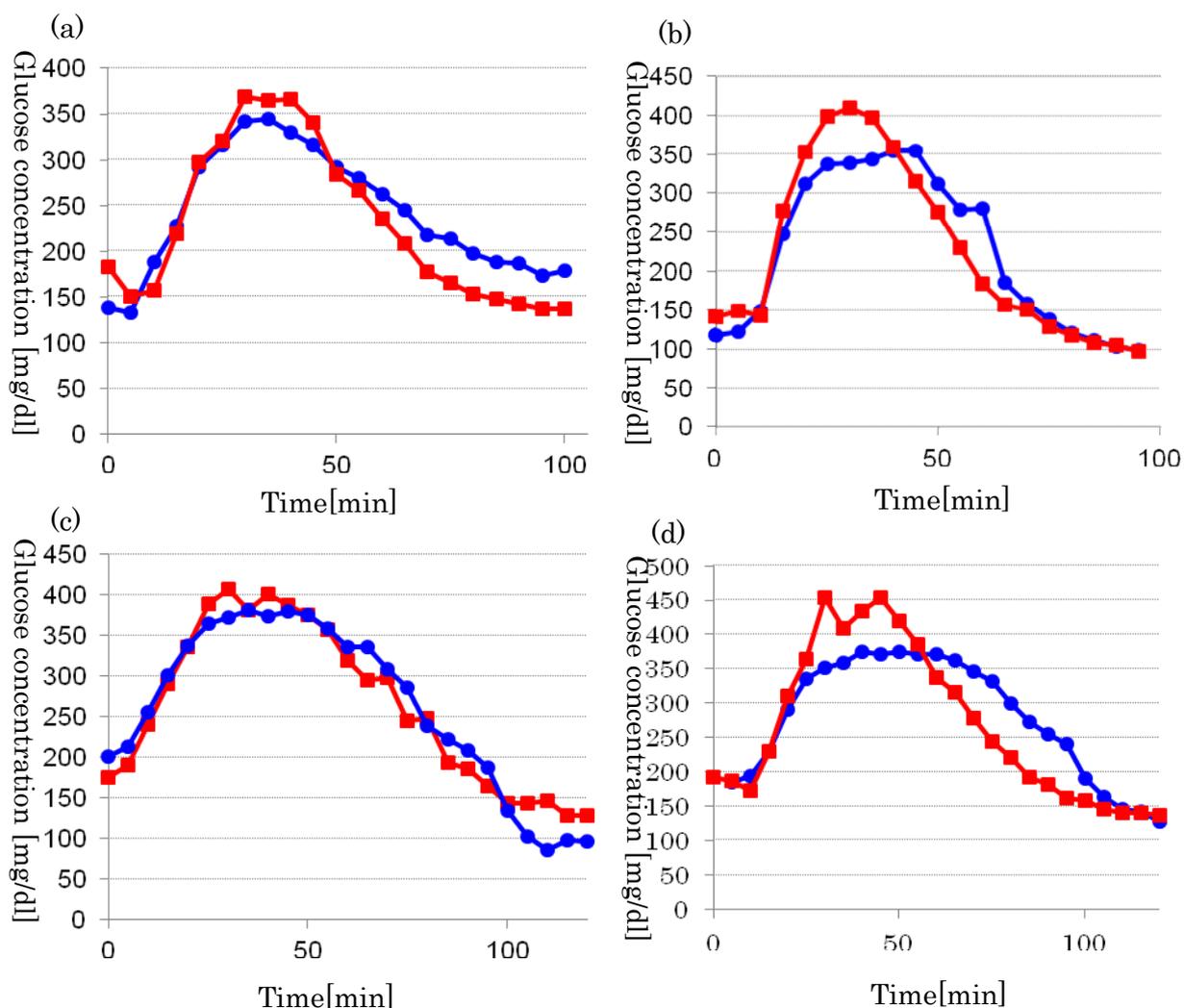
※埋め込み当日を Day0 とした。

図①-(2A)-1.22 糖負荷試験実施スケジュール

図①-(2A)-1.23 に示すように、埋め込み直後から 14 日にかけて測定した値は血糖値の変動に追従した。また、全プロットについて、CEGA の A 領域にプロットされたデータの割合は、73%であった (図①-(2A)-1.24)。これは、一般の埋め込み型センサよりも高い値である。さらに、糖負荷実験を行った日ごとの A 領域にプロットされるデータの割合を調べた結果を図①-(2A)-1.25 に示す。埋め込み後 1 日目までは 50~60%程度であったが、埋め込み後 2 日以降は 90%以上の高い割合となった。90%以上の存在率は観血式の血糖測定機と同程度の測定精度であり、本センサを使った血糖測定の測定精度が高いということが示唆される。なお、埋め込み直後の存在率が落ちる原因として、埋め込みによる出血や炎症反応が考えられる。出血や炎症反応は励起光と蛍光の減衰を招くため、測定の障害となる。今後、埋め込み直後からの測定精度を向上させる手段として、血管を避け、炎症を抑える埋め込み手技の開発が必要であると考えられる。

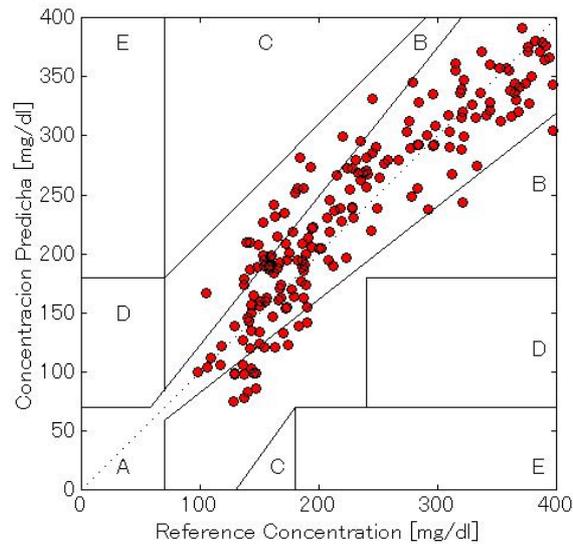
14 日目の観察結果では、A領域に存在するプロットの割合が落ちているが、

現在市販されている半埋め込み型センサと同程度である。14 日後に測定精度が落ちる原因としては、ラットの成長や埋め込み後の回復に伴い、皮膚が厚くなってしまったことや周りの代謝が変化した可能性が考えられる。今後、さらなる実証化のプロセスにおいては、埋め込み後のゲルファイバーから皮膚表面までの距離についても切片を作製し、詳細に埋め込み部位の検証する必要があることが分かった。また、一定の厚さに埋めることや埋め込み後、傷の回復に伴う埋込み部位の状態変化を予測することは難しいことから、経時的なキャリブレーションの方法やデバイスでの対応も合わせて必要であることが示唆された。

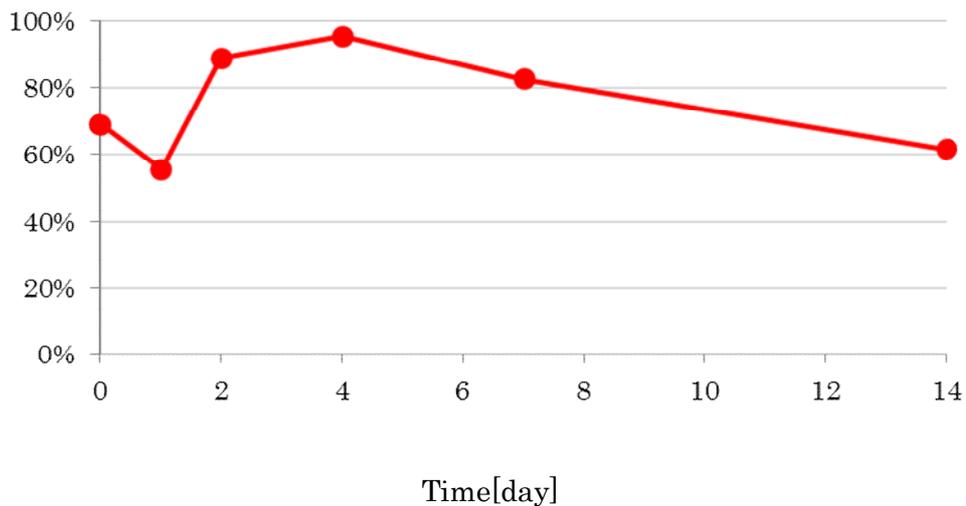


図①-(2A)-1.23 推定血糖値の血糖値変動追従性(a)Day0, (b)Day2,(c)Day7,(d)Day14

赤：血糖値 青：推定血糖値（センサの値）



図①-(2A)-1.24 Day0 ~ 14 の全プロットにおける CEGA



図①-(2A)-1.25 各糖負荷試験においてA領域にプロットされたデータの割合

c. 蛍光ゲル劣化の評価

蛍光色素を使用することの利点は、これまでの酵素型センサと違い、温度による劣化やタンパク質による分解を受けにくいことにある。しかし、本研究で使用している蛍光色素も経時劣化や測定に使用している紫外光による劣化の影響は避けられない。蛍光色素が劣化すると蛍光強度も落ちてくるため、劣化に合わせた蛍光強度の補正が必要となる。実用化へ向けては、蛍光強度劣化速度を考慮した測定方法の最適化と、補正方法が必要となる。本項では、実用化へ向けた蛍光劣化の初期検討として、測定間隔と劣化の関係について調べた。

なお、測定では溶液の交換と長時間の連続測定が必要となるため、専用の測定装置も作製した。

ア. 実験方法

<ゲルサンプル作成>

[実験器具・装置]

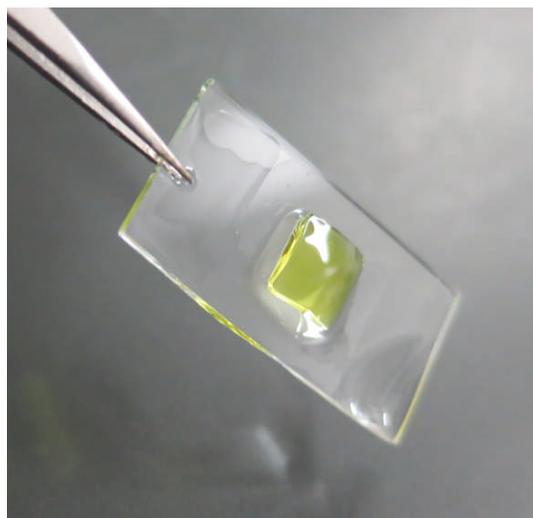
PET フィルム、ソフトシリコンゴム (1mm)、分銅 (15g)

[試薬類]

アクリルアミド(AAm) 15wt%、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(Bis-AAm) 0.3wt%、過硫酸ナトリウム(APS) 0.36wt%、N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TEMED) 0.2wt%、糖応答性蛍光色素(S-41)10wt%

[作製手順]

1. アクリルアミドゲル溶液を用意し、シランカップリング処理をしたガラス基板上に滴下した。
2. PET フィルムを乗せ、分銅で上から抑えた。
3. 5～10 分ほど室温で放置後、mili-Q 水で浸して振とう台上に 1～2 日程度放置した。
4. PET フィルムが剥がれ、ガラス基板に接着した蛍光ゲルサンプルが得られた (図①-(2A)-1.26)。



図①-(2A)-1.26 連続測定用サンプル

<測定装置作製>

[構成部品]

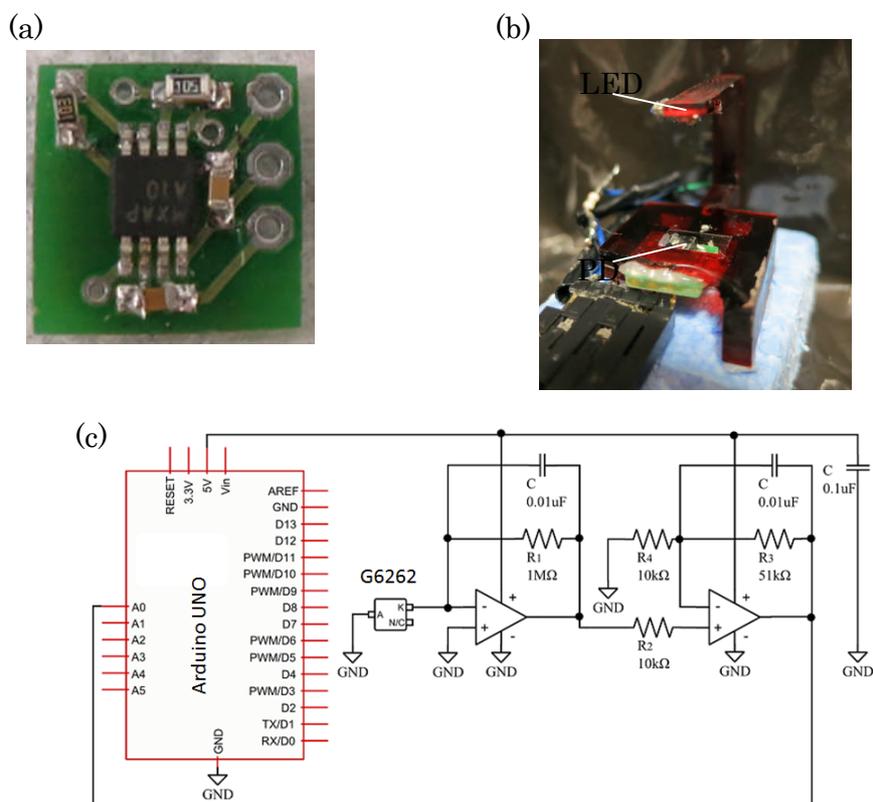
チップ抵抗 (1 M Ω)、チップコンデンサ (0.01 μ F, 0.1 μ F)、表面実装型紫外光 LED (BIVAR 中心波長 405nm)、フォトダイオード (G6262 浜松ホトニクス) 基板 (設計後、業者に作製依頼 図①-(2A)-1.27a) マイコンボード (スイッチサイエンス、Arduino UNO R3)、MATLAB (Arduino 制御ライブラリ)、筐体 (光造形にて作製)

[電子回路]

PDを検出し、I・V変換で電圧に変換、その後増幅した。増幅されたシグナルをマイコンへ送り、マイコン内で1024階調にデジタル変換した後、パソコンへ出力した (図①-(2A)-1.27c)。

[装置組み立て]

測定装置の筐体は光造形にて作製し、そこに上記構成部品を組み込んだ。測定はシャーレ上で行われるため、筐体底面はシャーレが乗るように設計した (図①-(2A)-1.27b)。



図①-(2A)-1.27 (a)測定用基板 (b)測定装置外観 (c)測定回路

<長期蛍光強度測定>

[実験器具・装置]

蛍光測定用装置、ペリスターポンプ、恒温槽、暗幕、MATLAB (PC)

[試薬類]

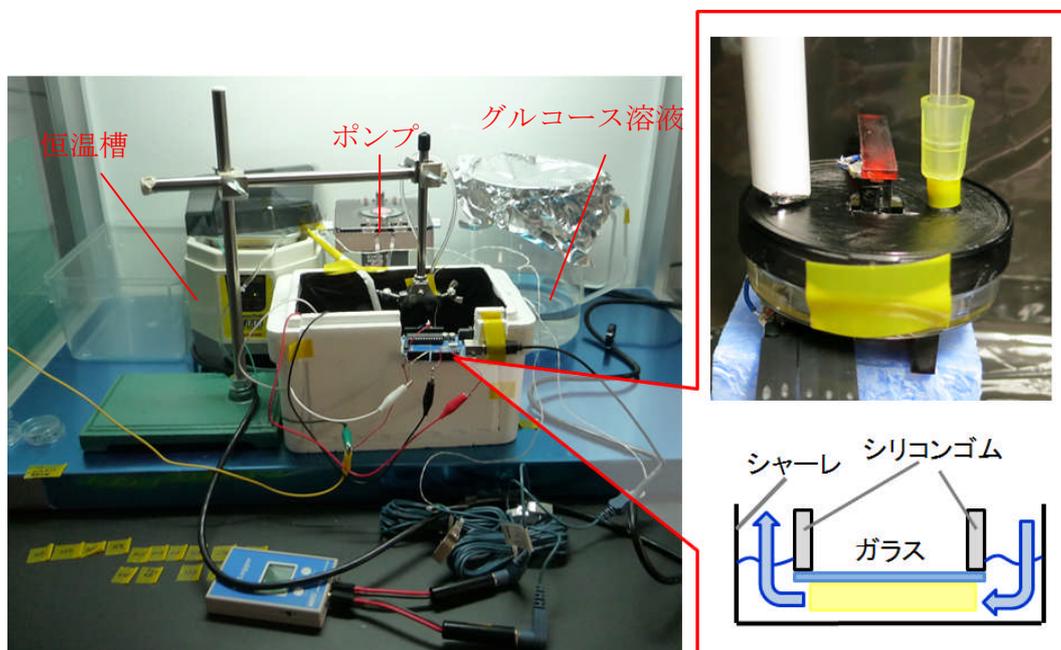
測定用サンプル、グルコース溶液 (125, 250mg/dl)

[実験条件]

温度 : 36°C 測定間隔 : 1, 5, 10 分 測定時間 : 1 秒

[実験手順]

1. 図①-(2A)-1.28 に示すように実験装置をセットアップした。蛍光強度は生体内と同様の強さになるよう PC 側から調節した。
2. 測定前に濃度 0mg/dl の状態を作るため、まずは5時間程度、蒸留水を流し、ゲルをチャンバ内を蒸留水で満たした。
3. 3時間程度蒸留水の測定を続けた後、濃度125mg/dl のグルコース溶液を流し、値が一定になるまで、24時間放置した。
4. 125mg/dl で一定になった後、濃度 250mg/dl のグルコース溶液に交換し、5時間程度放置し、その後 125mg/dl の溶液に戻した。この操作を1日1回実施した。



図①-(2A)-1.28 in vitro 測定システム

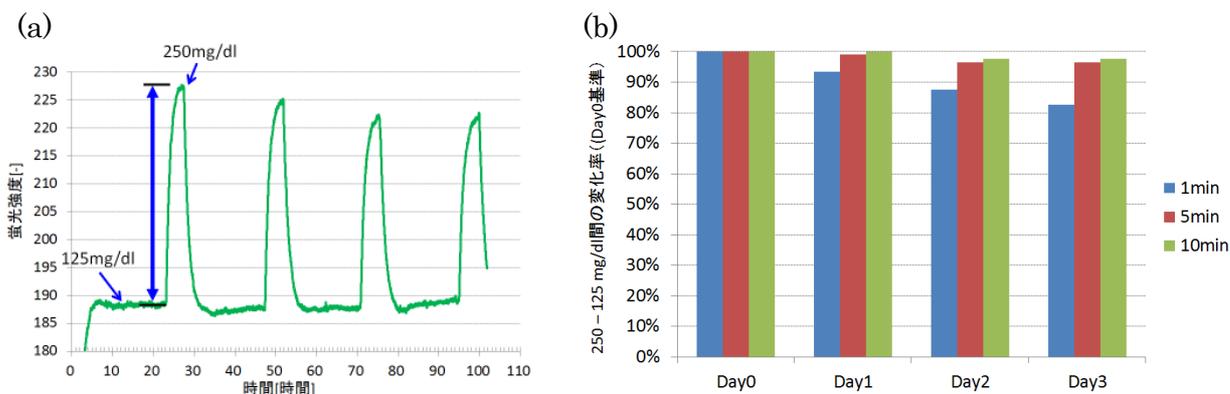
イ. 結果・考察

< 蛍光劣化と測定間の関係 >

図①-(2A)-1.29a に、4 日間測定した結果を示す。高濃度溶液に変更すると、蛍光強度が上昇する。蛍光変動の山ができる直前と頂点部分の 5 点をそれぞれの山ごとに平均化し、両者を引き算し、蛍光変動値とした。蛍光劣化が進むと変動の幅も変化する。なお、本来は同じ濃度で測定し続けることが好ましいが、LED や PD にも長期測定における劣化の影響が懸念されるため、今回は短時間内の引き算によりこれらの影響を排除することにした。また、過去の実験で示してきた蛍光強度の変化にはこれほど時間はかからない。今回はガラス基板と底面のシャーレに接着しているため、溶液の浸潤に時間がかかっている。

4 日間測定した場合の蛍光強度変化について、初日を 100%とした場の 1 日ごとの変動の様子を図①-(2A)-1.29b に示す。Day3 における劣化度を評価したところ、測定間 1 分では、17%も蛍光強度が落ちていることが分かった。一方、5 分では 3%、10 分では 2%程度の変化であった。蛍光劣化の大きさは、光を与えた時間の積分となると考えられるため、これらの数値はほぼ理論通りである。このまま劣化が続くと測定間隔 1 分では 3 週間、5 分では 15 週間（約 4 か月）、10 分では 30 週間（約 8 ヶ月）で蛍光変動が 0 になると予想される。ただし、埋め込みによる外部環境要因も考えると、これらの期間はさらに短くなると考えられる。

現在市販されている連続血糖測定器の測定間隔は 5 分、血糖センサの寿命は 3 日間である。我々の作製した血糖センサが 3 ヶ月以上の機能性を保持して



図①-(2A)-1.29 長期蛍光測定結果 (a)4 日間の連続測定 (b)蛍光劣化度評価

いることは既に過去の研究成果で示した。この機能をさらに向上させフルタイムでの連続測定を実現するとともに、現行商品と変わらない測定間隔を実現するためには、測定間隔 5 分が適当であることが、本研究より示唆される。

d. ラット覚醒下蛍光強度測定システムの構築及び連続測定の実施

これまでの研究において、糖応答性蛍光ゲルセンサが体内グルコース濃度の検出に適していることを様々な方法で示してきた。しかし、連続血糖測定の実用化へ向けには、その検出装置を備え、システムとして構築することが必要となる。これまでの実験では蛍光検出に蛍光実体顕微鏡を用いて、画像解析による測定を試みてきた。しかし、これではサイズが大きく、体へ常に装着して測定するような装置へと実用化することはできない。そこで本項では、市販の LED と PD を使い、ラットの耳に装着できるシンプルな装置の開発と、無線通信を使ったデータ処理システムを構築し、ラット覚醒下での連続蛍光測定を試みた。

ア. 実験方法

<原理確認>

[実験器具・装置]

前述の長期蛍光測定用の準備と同じ。

[試薬類]

測定用サンプル、グルコース溶液 (0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000mg/dl)

[実験手順]

1. 図①-(2A)-1.28 に示すように実験装置をセットアップした。
2. 0mg/dl の溶液から測定を開始した。
3. グルコース溶液を交換し 50 分ほど放置した。この操作を濃度が低いほうから順に行った。

<装着型蛍光測定器>

[構成部品]

チップ抵抗 (1 M Ω)、チップコンデンサ (0.01 μ F, 0.1 μ F)、表面実装型紫外光 LED (BIVAR 中心波長 405nm)、フォトダイオード (G6262 浜松ホトニクス) フレキシブル基板 (設計後、業者に作製依頼) マイコンボード (スイッチサイエンス、Arduino Fio)、MATLAB (Arduino 制御ライブラリ)、筐体 (光造

形にて作製)、enloop Pro、接着剤(スコッチ、プレミアゴールド ブラック)、Xbee Pro S1 (スイッチサイエンス)、ポリイミドテープ

[電子回路]

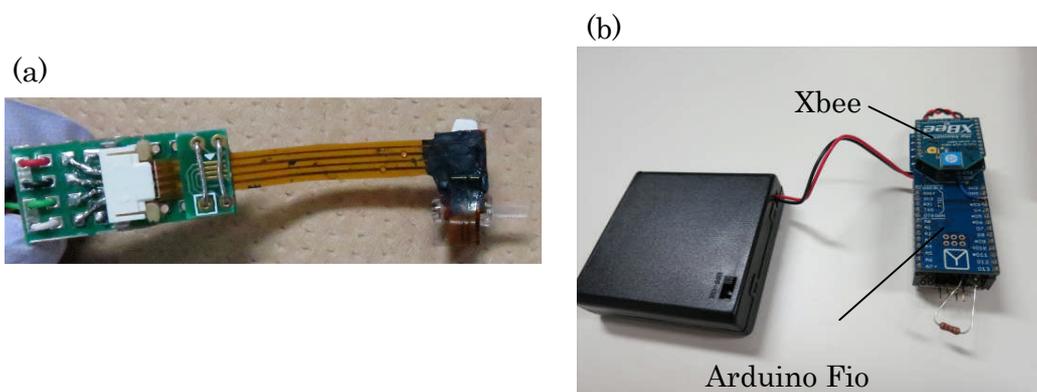
基本は in vitro 蛍光測定器と同じ (図①-(2A)-1.27c)。

[検出部]

測定装置の筐体は光造形にて作製し、部品を乗せたフレキシブル基板を設置し、接着剤で固定した。図①-(2A)-1.30a に検出部の完成品を示す。

[無線部]

無線通信には、市販の Xbee を使用した。Xbee を無線専用のマイコン Arduino Fio に取り付け、通信用アダプタを備えた PC との無線通信を確立させた (図①-(2A)-1.30b)。



図①-(2A)-1.30 覚醒下測定装置 (a)検出部、(b)制御部

<切片作成方法>

[実験器具・装置]

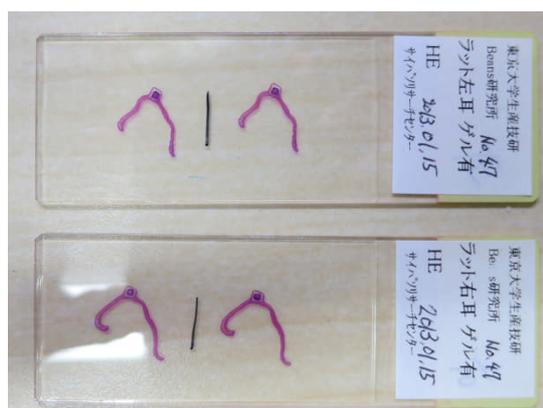
手術器具

[試薬類]

ホルマリン中性緩衝液 10%

[実験手順]

1. ラットを所定の安楽死法に従って、安楽死させた。
2. 埋め込まれたゲルを切断しないように、耳だけを切り落とした。
3. 切り落とした耳をホルマリンに浸けて3日放置した。
4. ホルマリン浸漬後、HE染色は業者に依頼した (図①-(2A)-1.31)。



図①-(2A)-1.31 蛍光測定終了後の切片サンプル

<麻酔下糖負荷試験>

[実験器具・装置]

装着型蛍光測定器、PC (MATLAB)、血糖測定機 (accu-check, Roche)、キズパワーパッド (Johnson & Johnson)、アロンアルファ (東亜合成株式会社)、眉そり用バリカン (耳の除毛用)

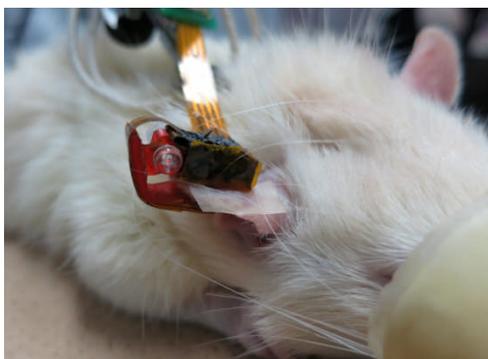
[試薬類]

50% グルコース溶液、0.25% インスリン溶液、70%エタノール

[実験手順]

(蛍光測定器の装着)

1. ラットをイソフルラン吸引麻酔で眠らせた。
2. ラットの耳を眉剃り用のバリカンで除毛した。
3. エタノールを綿球に染み込ませ、耳を脱脂した。
4. 蛍光ゲルの周りにキズパワーパッドを貼り付けた。
5. 装着型蛍光測定器を蛍光ゲルを覆うように設置し、キズパワーパッドと装置との間をアロンアルファで接着した (図①-(2A)-1.32)。



図①-(2A)-1.32 装着された蛍光検出装置

(糖負荷試験)

1. 蛍光の測定開始と同時に採血し血糖測定器で血糖値を測定した。以降は、血糖 5 分毎に血糖値を測定した。
2. 測定開始から 10 分以降で測定値が一定になったら、グルコース溶液(0.5 ~2ml) を腹腔内に打った。
3. 血糖値上昇後、値がプラトーになった時点でインスリン溶液 (0.5ml 以下) を腹腔内に打った。
4. 血糖値が下がり、ほぼ一定になったところで実験を終了することとした。

<覚醒下測定>

[実験器具・装置]

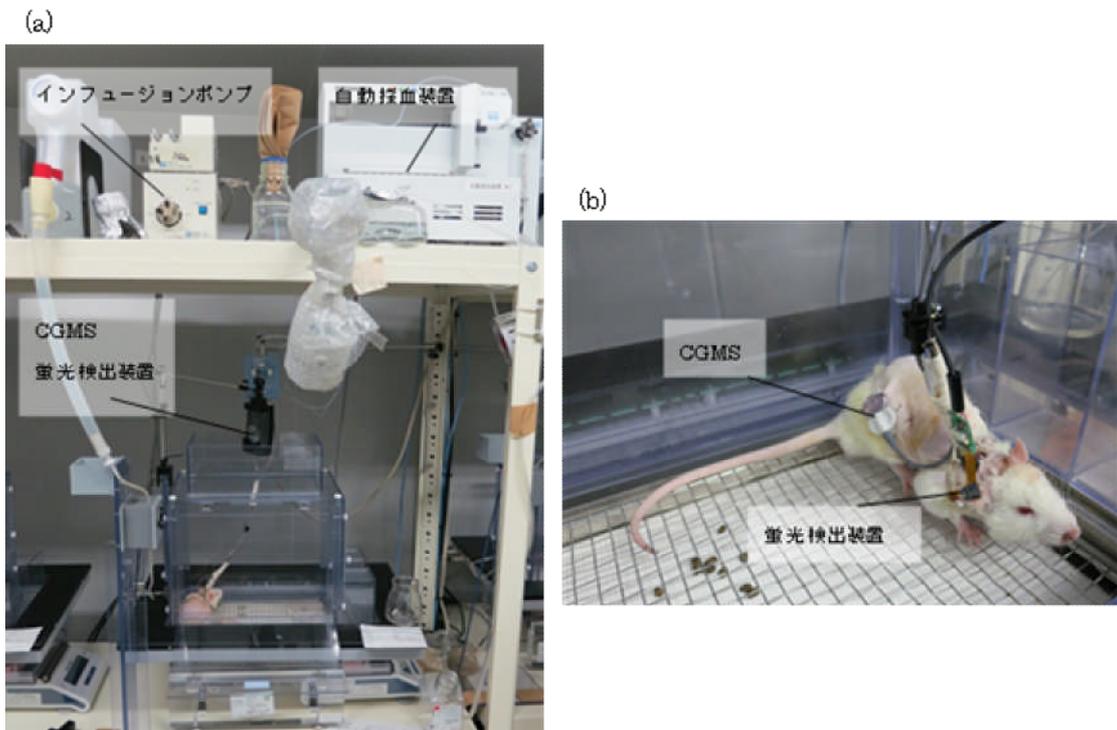
装着型蛍光測定器、PC (MATLAB)、血糖測定機 (accu-check, Roche)、キズパワーパッド (Johnson & Johnson)、アロンアルファ (東亜合成株式会社)、眉そり用バリカン (耳の除毛用)、ハーネス、自動採血装置 (EICOM)、インフュージョンポンプ (EICOM)、連続血糖測定器 (CGMS、miniMed)、回転台、採血・投与用ライン、各種手術器具、高糖食 (シュクロース 60%、リサーチダイエット)

[試薬類]

50% グルコース溶液、0.25% インスリン溶液、70%エタノール

[覚醒下測定システム概要]

覚醒下測定システムは大きく分けて、装着型蛍光測定装置、CGMS、自動採血装置、グルコース投与用インフュージョンポンプの 4 つから構成される (図 ①-(2A)-1.33)。また、ラットの動きに合わせて装置が回転し、コードが絡まないようにするため、装置を支持できる回転台を作製した。この回転台に蛍光測定装置のコントロール部と CGMS の両方を設置した。また、ラットにカニューレションされたグルコース溶液投与及び採血用のラインも本回転台内部に設置されたシーベルを介して自動採血装置へと接続されている。これにより、ラットへ装着された全ての装置はラットの動きに左右されることなく機能できる。



図①-(2A)-1.33 覚醒下ラット測定システム (a)測定システム全体像 (b)センサ、ラインを装着したラット

[実験手順]

(蛍光測定器の装着)

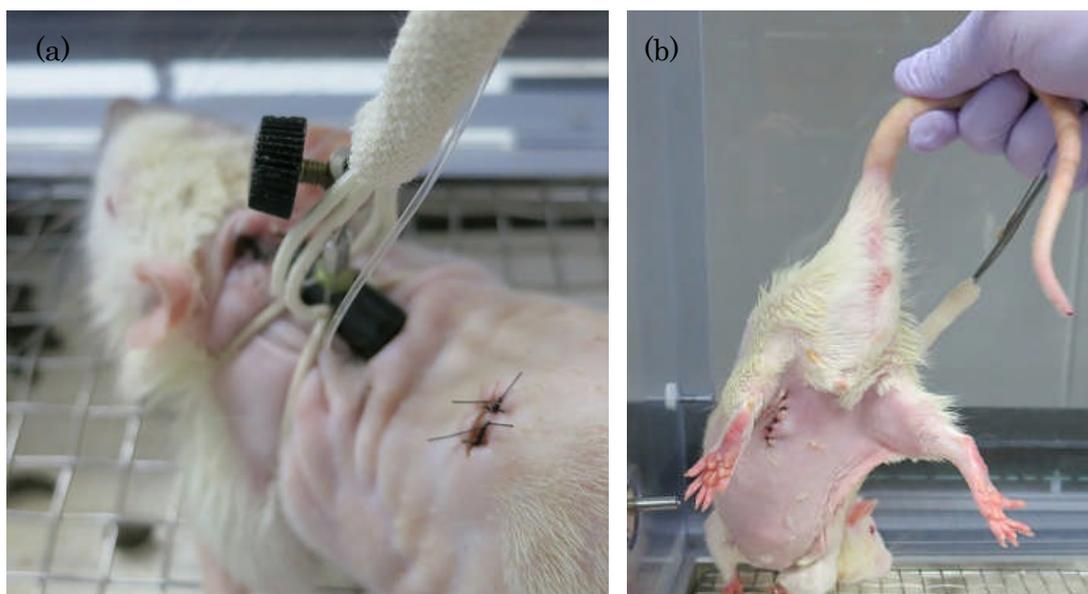
蛍光検出装置の装着方法は、麻酔下測定と同様なので省略する。

(採血・薬剤投与用ライン挿入)

※採血用のラインは頸静脈、薬剤投与用ラインは下肢静脈に挿入した。基本的に同様の手技となるため、一般化した挿入方法を以下記載する。

1. 実験の前に手術部を除毛した。除毛方法は、前述の方法と同様。
2. ラットをイソフルラン吸引麻酔で眠らせた。
3. 手術部を消毒し、ハサミで皮膚に切り込みを入れた。
4. 目的の血管周囲の組織を剥離した。
5. 剥離された血管にマイクロハサミで切り込みを入れ、カニューレーション用のチューブを挿入した。
6. 挿入したチューブは抜けないように糸で内部の組織にくくりつけた。
7. 手術終了後傷口を縫った。

※埋め込み場所とチューブの位置を図①-(2A)-1.34 に示す。



図①-(2A)-1.34 手術後のラット (a)下肢へ挿入した薬剤投与ラインの背中側、(b)下肢への手術場所

(覚醒下糖負荷試験)

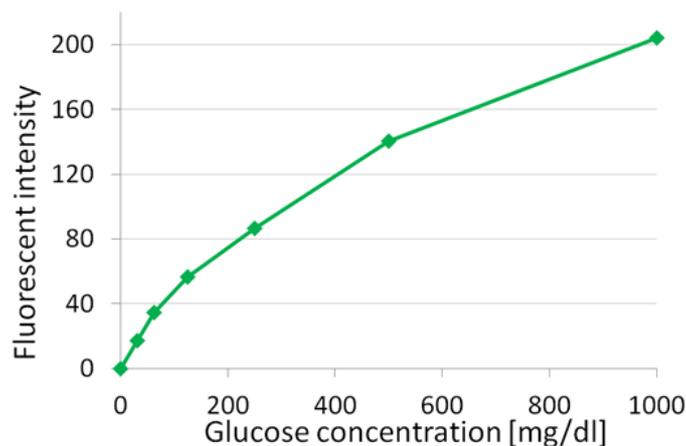
覚醒下で効率的に血糖を上昇させるため、上記作製した投薬ラインを通じてグルコース溶液を直接血管内に投与した。投与条件は、 $33\mu\text{l}/\text{min}$ 、 30min として、1日の投与量は 1ml までとした。同時に実施した自動採血では、1回の採血量を最小の $30\mu\text{l}$ とし、1日の実験で総量最大 $500\mu\text{l}$ としてラットの体に負担がかからないようにすすめた。

また、通常の食餌も高糖食を与えて、普段よりも大きな血糖変動を測定しやすい環境を整えた。

イ. 結果・考察

<原理確認 (濃度) >

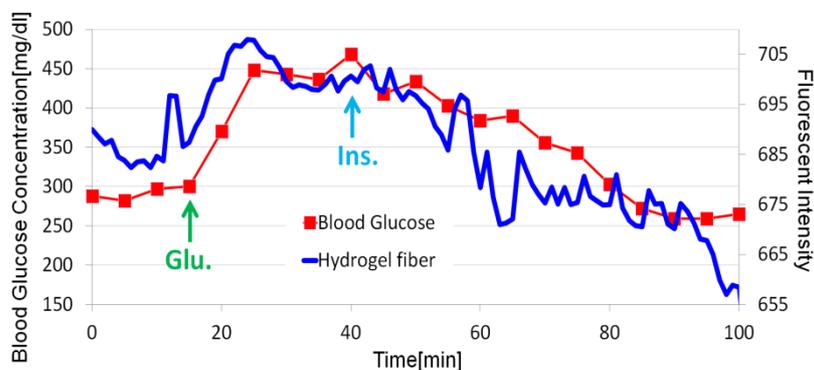
図①-(2A)-1.35 に、グルコース濃度と蛍光測定装置で測定した蛍光強度の関係を示す。グルコース濃度の上昇に伴い蛍光強度も上昇しており、測定に必要なとされるグルコース濃度範囲 ($0\sim 1000\text{mg}/\text{dl}$) で蛍光検出装置が機能することがわかった。なお、グラフが完全な線形ではなく、高濃度となるに従って徐々に直線の傾きが小さくなるのは使用している蛍光色素の特徴であり、本蛍光測定装置でもその特性を再現できている。これらのことから、我々の作製した蛍光測定装置は蛍光ゲルの測定に使えることがわかった。



図①-(2A)-1.35 グルコース濃度と蛍光測定装置で測定した蛍光強度の関係

<麻酔下測定>

蛍光検出装置での経皮的な測定が可能であるか評価するため、覚醒下測定を実施する前に、麻酔下測定を実施した。蛍光検出装置を用いて実施した麻酔下糖負荷試験の結果を図①-(2A)-1.36 に示す。赤の血糖値の変動に対して、青で示した蛍光測定値は追従しており、これまでの実体顕微鏡と同様の測定が可能であることがわかった。なお、測定値はノイズを多く含んでおり、値の上下動が大きくなることがある。当初これらノイズの原因は外乱光と考えていたが、暗闇の中で実験を実施しても同様の結果であったため、外乱光の影響ではなかった。ただし、本研究内ではフィルタを最適化していないため、測定光が皮膚を通過する際に何らかの皮膚の状態による透過光量変化があった可能性が考えられる。今後実用化へ向けては、フィルタの最適化と皮膚状態へ対応するリファレンスの導入により、測定値の安定化を図る必要がある。

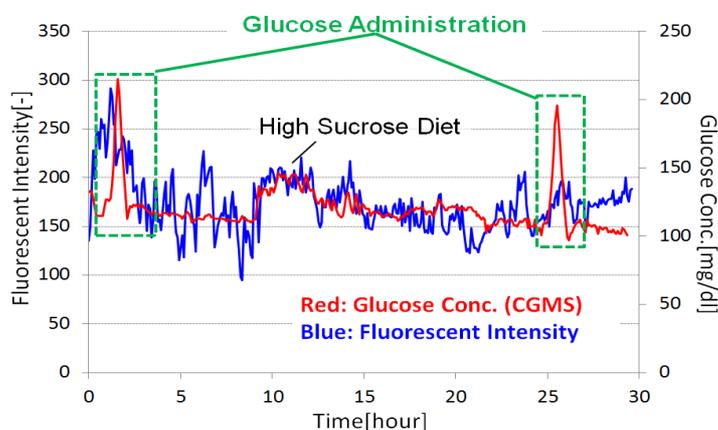


図①-(2A)-1.36 麻酔下糖負荷試験結果 (Day30)

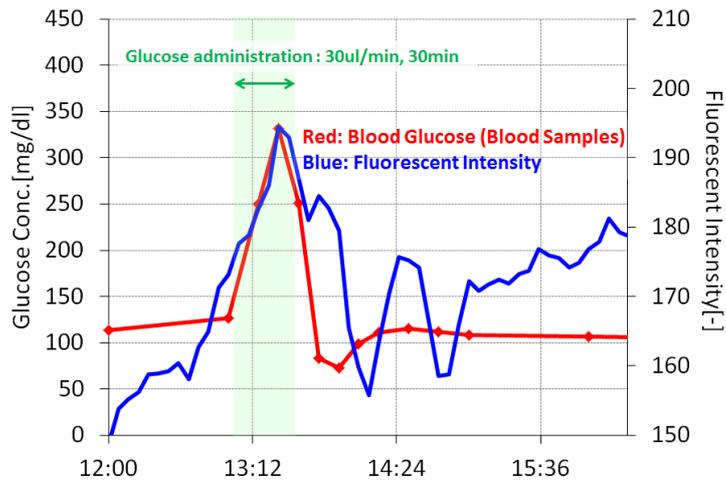
<覚醒下測定>

図①-(2A)-1.37 に、蛍光測定と CGMS の同時測定を 30 時間実施した結果を示す。青の蛍光強度変動には多くのノイズがのってしまっているが、赤の CGMS で測定した血糖変動と似たような挙動を示した。特に、二度の糖液負荷と、高糖食を与えた時の蛍光強度と血糖変動の上下動タイミングはほとんど一致していた。さらに、二度目の糖負荷について、採血した血液から測定した結果との比較を図①-(2A)-1.38 に示す。本結果についても、上昇のタイミング、ピークの位置が一致していた。これらの結果から、蛍光検出装置で測定した蛍光強度の変化は血糖変動を反映したものであることが示唆される。

しかし、麻酔下測定以上にノイズが大きくなっていた。これには主に次の 4 つの影響が考えられる。①覚醒下測定ではラットが装置を外そうとする動作。②体勢を変えるため、装着部位周辺の皮膚が多少引っ張られることによる測定部皮膚厚の変化。③ラットが動くことにより測定部が動く。内部のゲルも周囲の組織と一体化して完全に動かないわけではないので、ラットの動きによって測定部がずれる可能性がある。④ラットの皮膚の状態（色や温度など）が変化した。実用化へ向けては、これらのノイズ要因を精査し、リファレンス物質や光を利用することで、測定を安定化させることが必要となる。また、ノイズが大きいため測定精度は悪くなってしまうが、動きに合わせて装置が外れず、ずれにくくするなど機械的な工夫をするだけでも、麻酔下測定で得られているレベルまでは測定精度を向上させることができると考えられる。今後は、計測面と装置構造の工夫両面から進めることで、精度の高い測定へと発展することが期待される。



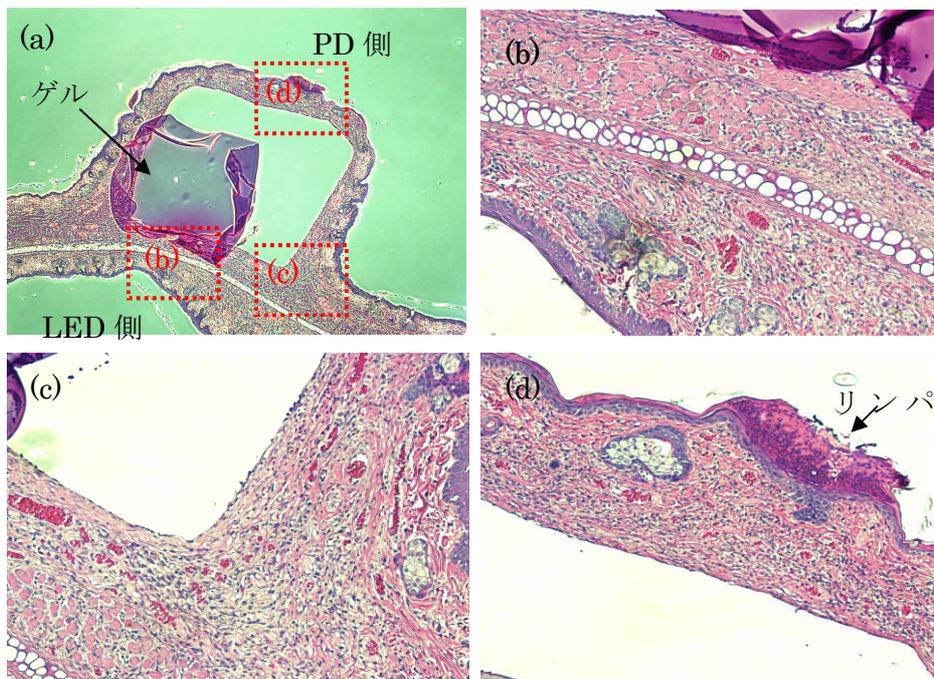
図①-(2A)-1.37 覚醒下連続測定結果



図①-(2A)-1.38 グルコース負荷時の蛍光・血糖変動 (拡大)

<測定による耳への影響評価>

蛍光測定装置は耳へ直接紫外光を当てるため、長時間にわたる測定では組織に異常な影響を与えてしまう可能性がある。そこで、連続測定装置を装着して7日間、5分ごとに紫外光をあて続けたラットについて、耳組織切片を作製し、組織に異常が起きていないか調べた。図①-(2A)-1.39 に顕微鏡で確認した組織の結果を示す。



図①-(2A)-1.39 測定後の耳切片写真 (a)10倍、(b,c,d)60倍

紫外 LED 光による異常があれば、組織全体に死細胞やマクロファージなどの細胞がみられるはずだが、組織内にそれらの反応は見られなかった (図①-(2A)-1.39b)。また、ゲル周辺の組織にも不要な組織化や炎症の様子はなかった (図①-(2A)-1.39c)。しかし、PD が装着されていた耳の外側には薄くリンパ球の死骸が存在した。装置と耳の摩擦や、装置着脱の際に傷つけてしまった可能性が考えられる (図①-(2A)-1.39c)。なお、この程度の炎症反応であれば、3 日程度で回復すると考えられるため、実際の測定では問題ない。

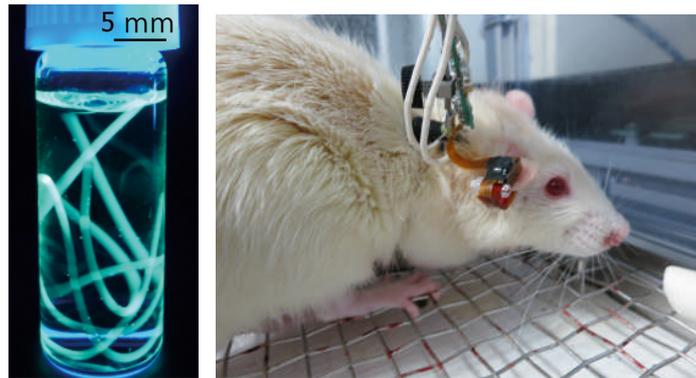
以上より、紫外光による組織への影響はほとんどないということがわかった。ただし、皮膚と装置の摩擦などによって傷つけてしまう可能性があるため、実用化へ向けた取り組みの中で、傷つけない装着方法の工夫が必要となるだろう。

(2A)-1-4 まとめ

(2A)-1-4-1 最終成果

本研究により得られた成果物は完全埋め込み型の血糖センサとそれを利用した連続蛍光測定装置の二つである (図①-(2A)-1.40)。血糖測定センサについては、PEG を導入した蛍光ゲルファイバーにより 140 日間という長期の機能性保持に成功した。これは、従来の半埋め込み型連続血糖測定用センサが 3～7 日間しか使うことができないのに対し、大きな優位性を持つと考えられる。そして、完全埋め込み型であるため感染のリスクが全くない点は、他の血糖センサ及び血糖測定方法にはない特徴である。また、血糖測定精度についても経皮的な測定で従来の連続血糖測定センサよりも測定精度が高く、一般に精度が高いと言われる観血式の血糖測定器と同程度であると示すことができた。現行使用されている連続血糖センサの課題は、センサ寿命の短さと感染リスク、測定精度が低いため使用が限定されることであるが、これらの課題を我々の作製した血糖センサにて解決できる可能性を示すことができた。

本研究で作製した血糖測定システムはラットの耳に特化しているが、ヒトへ応用する場合に必要とされるシステム構成や測定装置構造についての検討及び、今後の完全埋め込み型の血糖測定システム実現へ向けた取り組みを進める上でのプラットフォームを築くことができた。本計測システムを利用することで、実用化へ向けて必要なデータ収集も容易に実施することができる。本装置の特徴は、特許にもなった蛍光ゲルを位置決めできる構造と無線通信機能を備えていることである。無線化することで、装置の小型化が可能となり、装着容易な装置へと発展させることができる。また、蛍光ゲルと測定部の位置ズレはノイズの要因となるため、それに対処する構造を考案し特許化できたことも大きな成果である。



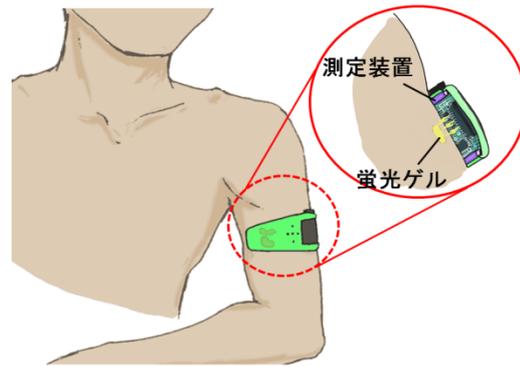
図①-(2A)-1.40 (a)蛍光ゲルファイバー、(b)蛍光測定装置

経皮的な測定を行う場合直接ヒトへ埋め込んで試験するのは、安全上難しい。しかし、本研究にてラットへ埋め込むことで皮膚や組織の状態、ラットの動きがノイズとなって測定値に現れることがわかった。これは、今後のヒトを目的とする実用化へ向けた信号補正の方法や参照光の導入を考える上で有用な情報となるだろう。

その他方法論として、生体適合性を向上させるために取り組んだポリマーブラシやナノインプリンティング、ナノパターンゲル表面の発想は、本蛍光ゲルだけでなく、他の埋め込みデバイスの生体適合性向上にも使えるアイデアである。ナノパターン表面の利用は、これまで埋め込みデバイスの表面を化学的な処理でコーティングして生体適合性を向上させてきたデバイスに対し、機械的な構造からもアプローチできる可能性を示すことができた。これらも、本研究で得られた成果として、他のデバイスへ応用していきたい。

(2A)-1-4-2 今後の展開

今後はヒトでの実用化へ向けて、簡単に埋め込みが可能で簡単に装着できる測定装置へと発展させることが期待される (図①-(2A)-1.41)。蛍光ゲルについては、本研究内で血糖測定に使えることを示すことができた。しかし、測定装置との組み合わせや、皮膚や外部からのノイズをキャンセルするためのリファレンス物質の導入、測定に適した形状への変更などさらなる改善の余地は残されている。また、生体適合性に関しても、ヒトへ埋め込む場合は高い安全性が要求されるため、ラットよりも大きな動物を使った実験や評価方法の検討が必要になる。



図①-(2A)-1.41 ヒトへの応用イメージ図

連続血糖測定器は人工膵臓への応用も可能である。特に人工膵臓では、連続血糖測定精度と測定期間が問題となることが多い。これらの課題を克服できる連続血糖測定器が存在せず、インスリンポンプとの連動アルゴリズム開発によって障害となっている。我々の血糖センサは測定精度が高く、長期の埋め込みが可能であるため、これらの課題を解決できる可能性が高い。人工膵臓が実現できれば、1型糖尿病患者のQOL向上に大きく貢献できるだろう。

最後に、繰り返しとなるが糖尿病はこれからも注目されていく病気の1つであり、測定機器や医薬品開発、治療方法などは益々発展していくことが予想される。我々も本研究で得られた血糖センサ及び測定システムの実用化へ向けた取り組みを今後も継続し、連続血糖測定システムの開発だけでなく、本デバイスを使って得られる様々な知見を糖尿病の課題解決へと役立てていきたい。

参考文献

- 1) D. R. Whiting, L. Guariguata, C. Weil, J. Shaw: *Diabetes Research and Clinical Practice*, Vol. 94, pp.311-321 (2011).
- 2) N. Unwin, D. Whiting, D. Gan, O. Jacqmain, G. Ghyoot: *IDF Diabetes Atlas Fifth edition*, International Diabetes Federation, 2011, pp.38-39
- 3) J. Y. Poirier, I. Guilhem, N. L. Prieur, H. Allannic, L. Campion, D. Maugeudre: *Diabetes Care*, Vol. 21, pp.1919-1924(1998)
- 4) S. F. Malin, T. L. Ruchti, T. B. Blank, S. N. Thennadil, S. L. Monfre: *Clinical Chemistry*, Vol. 45, No. 9, pp.1651-1658(1999)
- 5) H. M . Heise, R. Marbach, Th. Koschinsky, F. A. Gries: *Artificial Organs*, Vol. 18, No. 6, pp.439-447(1994)
- 6) R. J. Erckens, M. Motamedi, W. F. March: *J Ram Spec*, Vol. 28, pp293-299(1997).

(2A)-2 細胞の立体構造形成プロセスの開発

(2A)-2-1 はじめに

本プロジェクトでは、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。

生体肝臓において、肝細胞は極性、すなわち血管側膜と毛細胆管側膜を持つ。この特殊化した膜構造により、血管側から物質を細胞内に取込み、胆管側や血管側に細胞内で代謝された物質を排出している。平面培養した肝細胞では胆汁排出活性やトランスポータの局在といった極性を失っている。すなわち、生体内の肝臓で行われている正常な肝細胞への化合物の取込み、排出が起こらなくなっている。さらに、平面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。分散された肝細胞集団に極性を再構成させるための、さまざまな方法が開発研究されている。もっとも広く使われ、医薬品候補化合物の胆汁排出活性測定にも用いられている方法に、サンドイッチ培養法がある。サンドイッチ培養法の元法は、ゲル化したコラーゲンの表面に肝細胞を播種し、続いてその上にコラーゲンを重層して、細胞を 3 次元的な環境で培養するというものである。しかしながら、サンドイッチ培養法で作製される肝細胞の極性誘導は不均一である。したがって、肝細胞の極性化によって形成される代表的な構造物である、毛細胆管の形成位置や形状が不均一であり、その数や面積が限定されている。その結果、毛細胆管に排出される代謝物を直接回収して解析することはできない。毛細胆管構造がキレート剤により開放され、その内部の代謝物が培養液中に漏出してくることを利用して、代謝物を回収する方法がある。しかしながら、そのためにも比較的大量の細胞が必要であり、通常は一つのアッセイ当たり、表面積約 1.95cm^2 の培養器上に接着した約 20 万個の肝細胞を必要とする。また、この方法では、血管側代謝物と胆管側代謝物を区別することができないため、血管側代謝物サンプルと血管側胆管側代謝物サンプルを比較して間接的に予測するしかない、といった問題がある。

本研究開発課題では、肝細胞を用いて、毛細胆管構造を制御して形成するプロセスを開発し、より正確に生体の肝臓での代謝輸送を予測できるような肝細胞培

養系の確立を目指した。

要素研究を行うフェーズでは、ガス透過性の PDMS 製薄膜を用いて肝細胞の胆管形成過程を解析した。さらに、ガス透過性薄膜表面に線型および円型の微小溝を作製して、そこに肝細胞を制御してパターンニングするプロセスを検討したうえ、溝の形状によってどのような形状や大きさの毛細胆管ができるか検討して、毛細胆管形成制御のための指針を見出した。

その後の実証/基板技術研究のフェーズでは、要素研究で得られた知見により作製された細胞組織が創薬スクリーニングの現場で用いられるデバイスへの組み込み、及びそれを用いた試験サービスを実用化と想定し、「微細組織に化合物添加」、「代謝物抽出」、「分析して生体と同等のデータを取得する」、といった一連の操作ができることを、試験デバイスを作製して実証することを目標とした。具体的には、要素研究で得た毛細胆管形成制御方法の指針に基づき、ガラス管などの微細管を毛細胆管構造に穿刺するのに最適な細胞配置方法を検討し、胆管構造内代謝物の抽出を実施した。すなわち、ガラスキャピラリで蛍光胆汁酸などの胆管代謝物を吸引して、定量分析するために、胆管面積、胆汁排出活性を最大にできるような、コラーゲングル円型窪みの面積および深さを決定し、配列を最適化した肝細胞集団から胆管代謝物を直接吸引して抽出し、分析できることを実証した。

(2A)-2-2 要素研究の概要 (H20-H22)

(2A)-2-2-1 中間目標

「細胞の空間的配置の制御等により毛細胆管構造などの微細組織構造を誘導する手法選定に関する指針を得る。」

具体的には、PDMS 製薄膜やコラーゲングル表面に微細な様々な形状の溝を形成し、その溝内にラット初代肝細胞を配置することで形成される毛細胆管構造を、毛細胆管に蓄積する蛍光基質の共焦点顕微鏡画像より解析し、肝細胞の配置と毛細胆管構造の形状の規則性を明らかにする。

節(2A)-2-2-21 では、ガス透過性 PDMS 薄膜基板の毛細胆管形成に及ぼす影響について解析した結果を報告する。

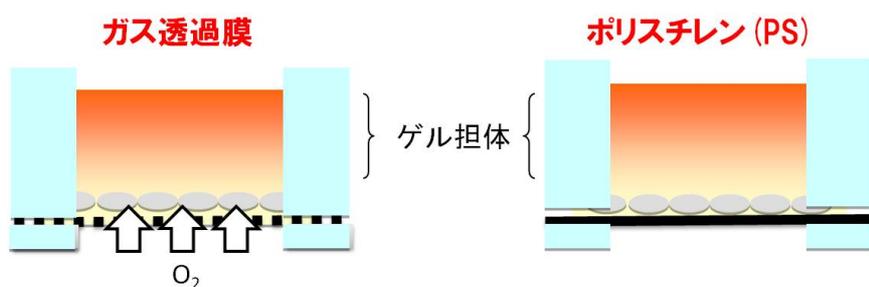
節(2A)-2-2-3 では、ガス透過性コラーゲングル表面に溝を作成し、そこに肝細胞を配列し、毛細胆管を形成するプロセスの検討結果について記載する。

(2A)-2-2-2 ガス透過性 PDMS 薄膜基板による毛細胆管形成の検討

肝細胞を立体的に配置する手法として、様々な表面処理を施した PDMS 薄膜基板表面を用いることを計画した。その予備検討の段階で、ガス透過性をもつ PDMS 薄膜表面上に接着した肝細胞が、従来のポリエチレン製基板より毛細胆管を効率よく形成することを見出した。本節ではガス透過性薄膜上で肝細胞を培養した時の毛細胆管形成の様相を報告する。

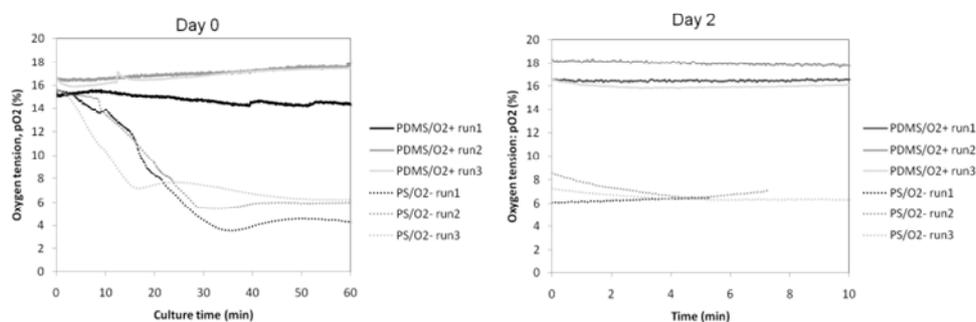
a. 酸素分圧を高めた肝細胞培養の作製

厚さ約 1 mm の PDMS 製薄膜を底部に張った 24 穴プレートを作製した。図①-(2A)-2.1 のように、ラットから調製した初代肝細胞を PDMS 膜プレート (PDMS) およびポリスチレン製プレート (PS) に播種し、マトリゲル含有培地で 37°C、5%CO₂ インキュベータを用いて培養した。



図①-(2A)-2.1 ガス透過性膜培養 (左) と従来のポリスチレン上での肝細胞サンドイッチ培養の模式図

細胞播種直後および、培養 2 日目に、培養培地中の肝細胞直上の酸素分圧を、酸素濃度計を用いて測定した (図①-(2A)-2.2)。

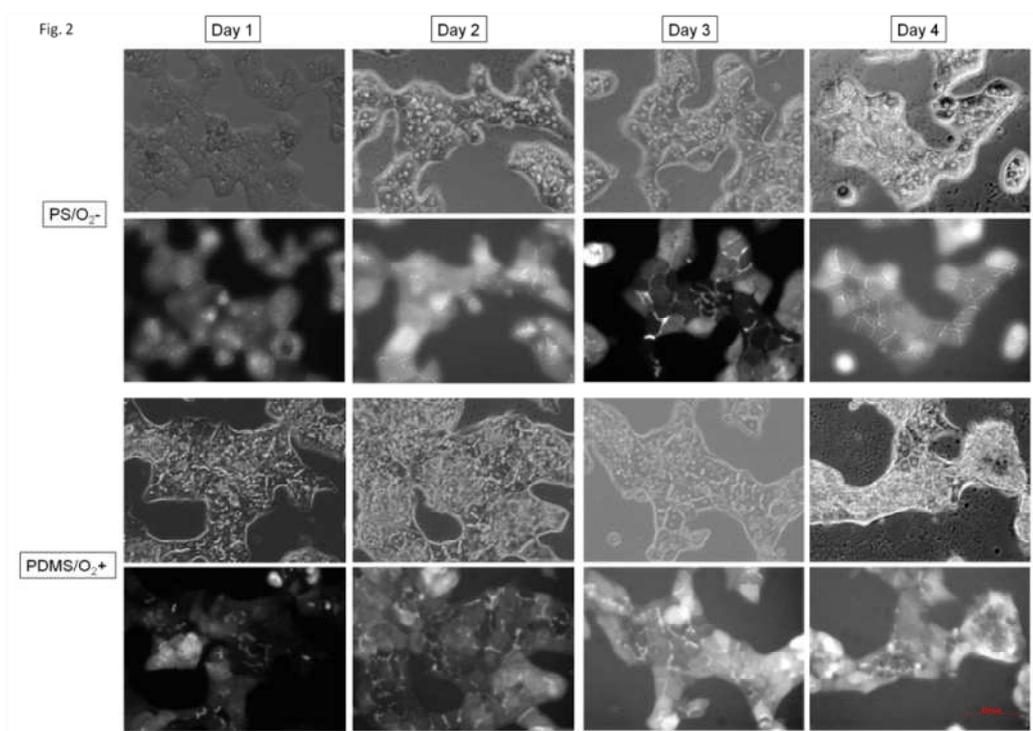


図①-(2A)-2.2 肝細胞培養開始直後 (左) および培養 2 日目 (右) の細胞近傍の酸素濃度

細胞播種直後においては、PS では酸素濃度が 60 分以内に 3~6%に低下したのに対して、PDMS では 60 分以降も 14~18%に保たれていた。この酸素濃度は培養 2 日目においても保たれていた。このことから、PS では酸素分圧 4%程度の低酸素状態、PDMS では酸素分圧 16%程度の富酸素状態で、肝細胞を培養していることが分かった。

b. 毛細胆管形成過程

肝細胞を播種した (0 日目とする) のち、1, 2, 3, 4 日目に、5 (and 6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA)を用いて、毛細胆管の染色を行った (図①-(2A)-2.3)。



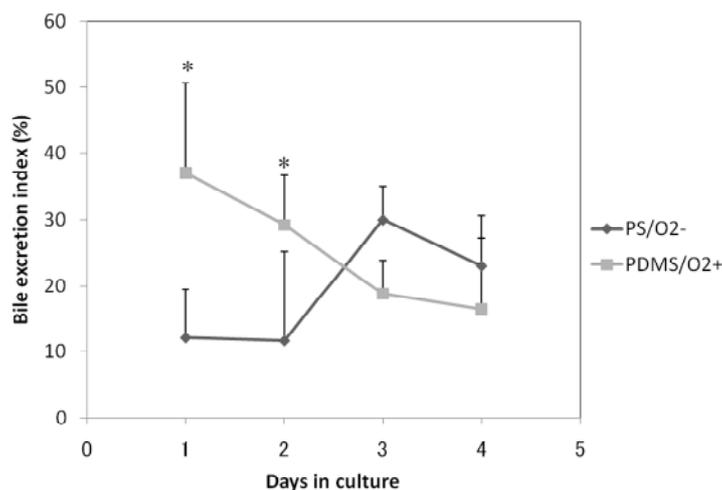
図①-(2A)-2.3 従来のポリスチレン基板上 (上) と PDMS 製ガス透過性膜上での肝細胞培養の様子と CDFDA 染色による毛細胆管形成の様子

PS で播種後 3 日目から毛細胆管が明瞭になるのに対して、PDMS では播種後 1 日目から毛細胆管の形成が見られ、播種後 4 日目まで維持されているのがわかった。

このことから、酸素透過性 PDMS 膜は、肝細胞の毛細胆管形成を促進する効果があると言える。

c. 胆汁排泄活性

続いて、トランスポータを介して毛細胆管へ輸送される薬物の試験への有効性を示すため、毛細胆管へ排出される CDFDA を定量することで、胆汁排泄活性を調べた (図①-(2A)-2.4)。



図①-(2A)-2.4 CDFDA を用いた胆汁排泄活性測定

(2A)-2-2-3 空間的に制御して配列した肝細胞による毛細胆管形状制御プロセス検討

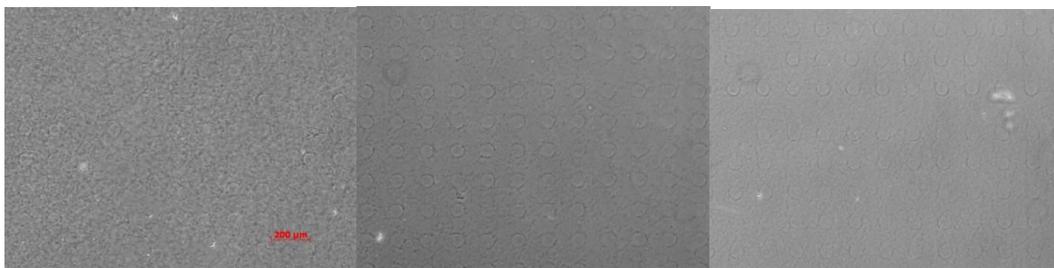
肝細胞を立体的に配置し、毛細胆管を制御して形成させる手法としてさまざまな検討を行った結果、ガス透過性膜上のコラーゲンゲル表面に微細な溝を形成し、その内部に肝細胞を配列する方法を選択するに至った。本節ではコラーゲンゲル表面に形成した微細な溝 (マイクロパターン化コラーゲンゲル) にラット初代肝細胞を配列するプロセス、および、マイクロパターン形状による毛細胆管形状の状態について報告する。

a. マイクロパターン化コラーゲンゲル作製のためのコラーゲン種類と濃度の検討

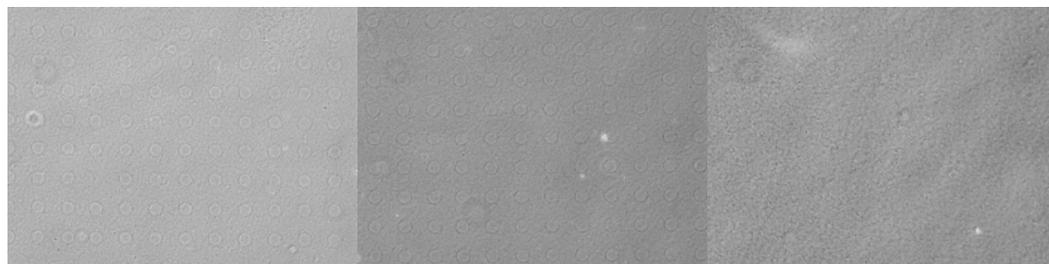
PDMS スタンプで窪み (マイクロパターン) を形成し、そのマイクロパターン内に肝細胞を配置する、というプロセスを用いることにした。はじめに、マイクロパターンを施すコラーゲンの最適なゲル種類と濃度を、形成されたマイクロパターンの形状により検討した。コラーゲンには、新田ゼラチン社製のゲル化するコラーゲンであるコラーゲン I-A および I-P を用いた。また、濃度は

当該コラーゲン製品から作製できる最も高濃度の 2.25 mg/mL から、1.5 mg/mL, 0.75 mg/mL とした。PDMS スタンプには直径 60 μ m の円形を用いた。

コラーゲン I-A (図①- (2A)-2.5) および 1.5mg/mL コラーゲン I-P (図①- (2A)-2.6) ではマイクロパターンの淵が歪んだものも多く、マイクロパターン形成が確実でないことがわかる。また、コラーゲン I-P では最も低濃度の 0.75mg/mL ではマイクロパターンが形成されなかった。したがって、今後のコラーゲンゲル表面へのマイクロパターン化に用いるコラーゲン組成は 2.25mg/mL コラーゲン I-P を用いると決定した。



図①- (2A)-2.5 マイクロパターン化コラーゲンゲル
コラーゲン I-A を用いた場合。:左から濃度 2.25mg/mL, 1.5mg/mL, 0.75mg/mL

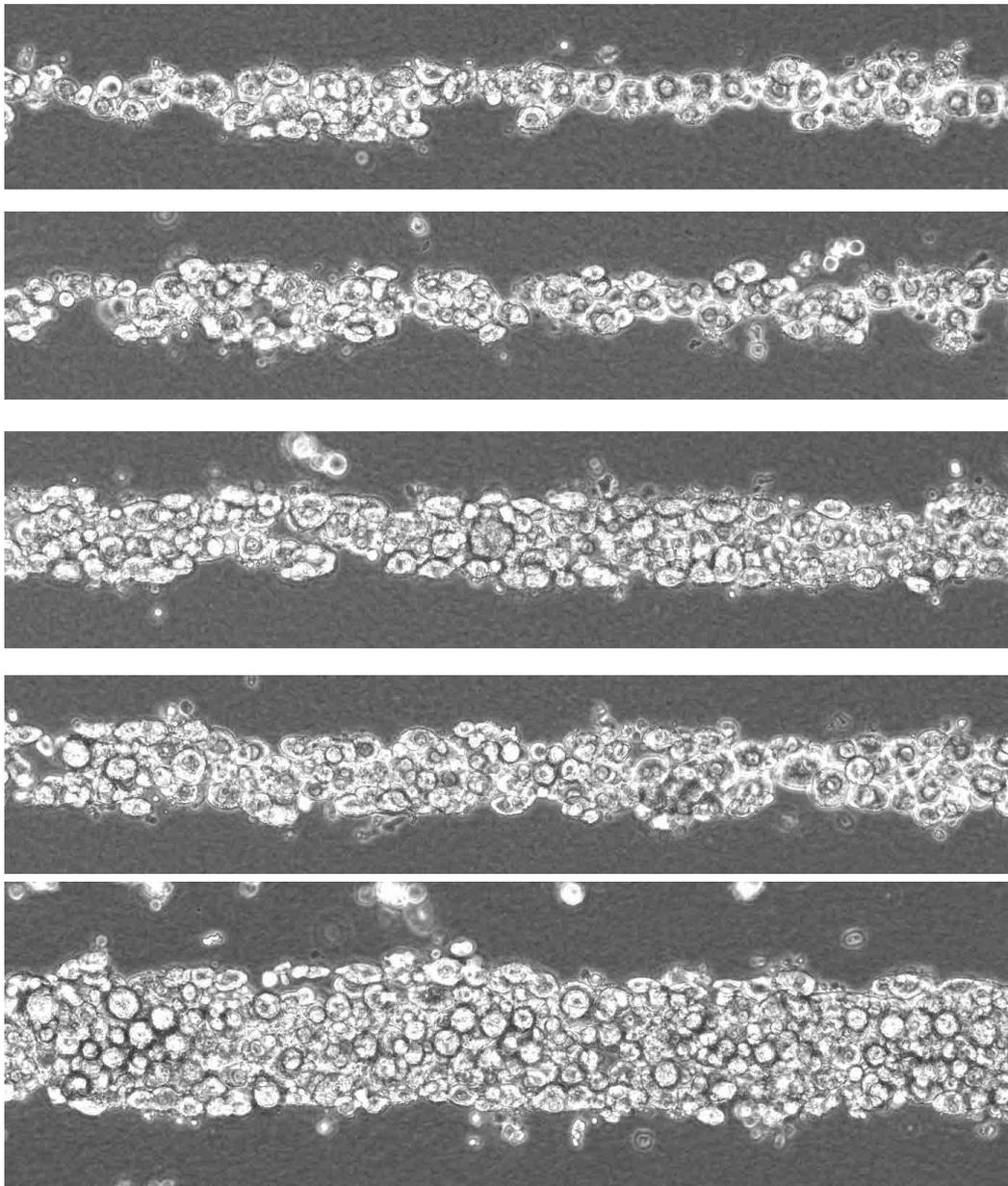


図①- (2A)-2.6 マイクロパターン化コラーゲンゲル
コラーゲン I-P を用いた場合。:左から濃度 2.25mg/mL, 1.5mg/mL, 0.75mg/mL

b. ラット初代肝細胞の配置プロセスの検討

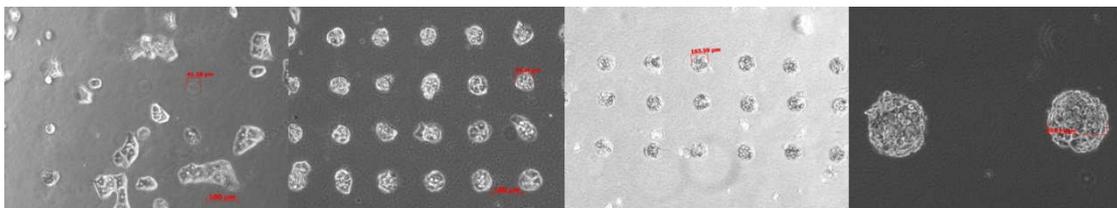
続いて、本方法を用いて初代肝細胞を配置できるマイクロパターンの形状とサイズを決定するため、コラーゲンゲル表面にいろいろなサイズの線形、円形のマイクロパターンを形成して、肝細胞の配置状態を評価した。

線形の場合、線幅が 20,30 μ m でもマイクロパターン内に配列はできるが、細胞配列が途切れる部分が多く生じた。40-100 μ m の範囲で細胞配列がほとんど途切れる部分なく配置させることができた (図①- (2A)-2.7)。



図①- (2A)-2.7 マイクロパターン化コラーゼンゲルへ配置された肝細胞
上からマイクロパターン線幅 20,30,40, 50, 100 μm の場合。

円形の場合、直径が $40\mu\text{m}$ ではマイクロパターン内に細胞が配置できない確率が高かった。 $60\text{-}200\mu\text{m}$ の範囲では高い頻度でマイクロパターン内部に細胞を配置することができた。(図①-(2A)-2.8)



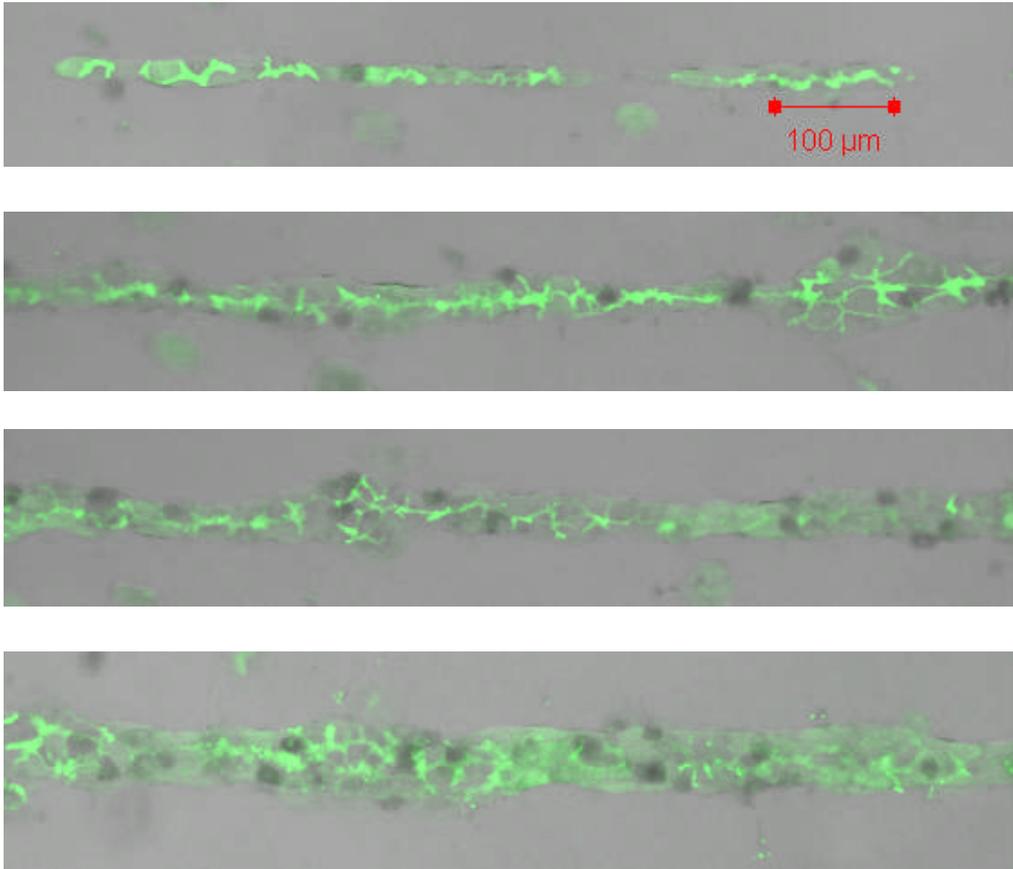
図①-(2A)-2.8 マイクロパターン化コラーゲンゲルへ配置された肝細胞
左からマイクロパターン直径 $40, 60, 100, 200\mu\text{m}$ の場合。

c. 肝細胞の配置状態による毛細胆管構造

ア. 線形溝

上記の検討で決定したコラーゲンゲル表面上のマイクロパターン化と細胞の配置方法により、幅 $20, 30, 40, 50\mu\text{m}$ の線形マイクロパターンに肝細胞を配置した。この細胞をサンドイッチ培養して、毛細胆管を形成させて、その構造を CLF の蓄積により可視化した。

幅 $30\mu\text{m}$ の線形マイクロパターンに肝細胞を配置したときにマイクロパターンに沿った毛細胆管形成が見られた (図①-(2A)-2.9)。この、位置的に制御された胆管形成は培養2日目には 1mm に満たないが、培養日数が長くなるほど、これらが連結して長くなる傾向が見られた。また、培養日数が長くなるほど、幅の広いマイクロパターンに配置された肝細胞でもマイクロパターンに沿った位置的に制御された毛細胆管形成が行われた。(表①-(2A)-2.1)



図①-(2A)-2.9 線形マイクロパターン化された肝細胞に形成された毛細胆管構造。上からマイクロパターン線幅 20, 30, 40, 50 μm の場合。

表①-(2A)-2.1 線形マイクロパターン化された肝細胞に形成された毛細胆管構造。連続した胆管の長さが○は 1000 μm 以上、 Δ は 100 μm ~1000 μm 、 \times は 100 μm 以下。—は細胞の配置が不十分。上から培養日数 3 日、7 日、10 日の場合。

day3	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.5mg/mL	—	\times							
2.1mg/mL	—	Δ	\times						

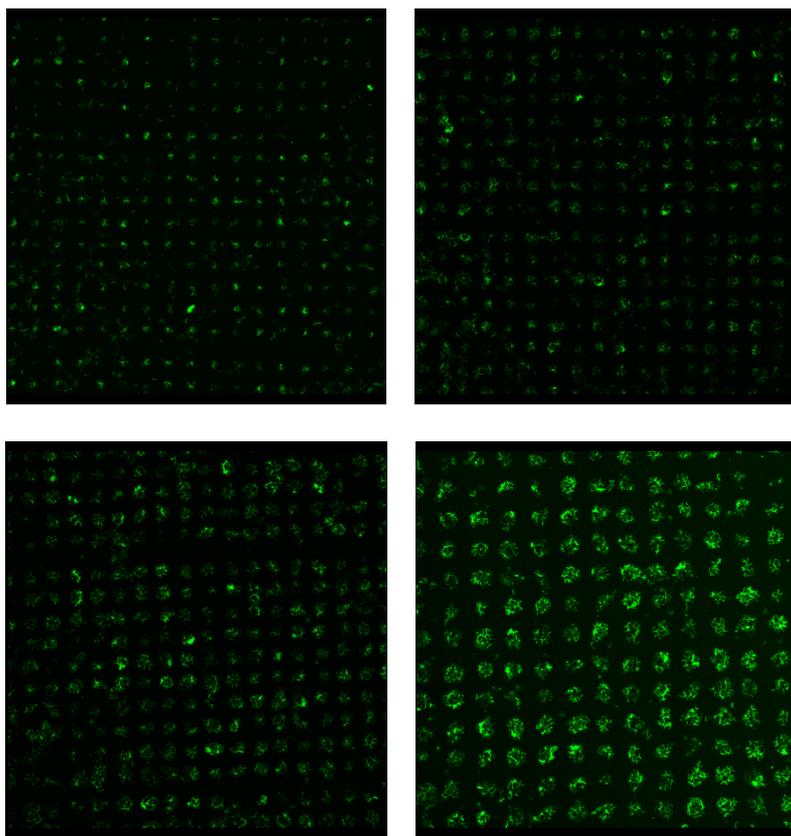
day7	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.5mg/mL	—	Δ	\times						
2.1mg/mL	—	○	Δ	Δ	\times	\times	\times	\times	\times

day10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
1.5mg/mL	—	○	○	○	○	\times	\times	\times	\times
2.1mg/mL	—	○	○	○	○	○	\times	\times	\times

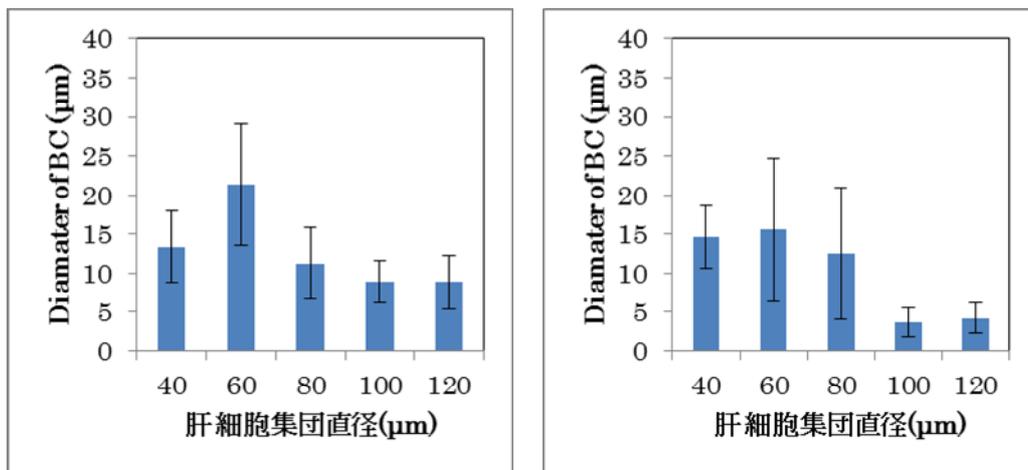
イ. 円形溝

上記の検討で決定したコラーゲンゲル表面上のマイクロパターン化と細胞の配置方法により、直径 60, 80, 100, 120 μm の円形マイクロパターンに肝細胞を配置した。この細胞をサンドイッチ培養して、毛細胆管を形成させて、培養 2 日目にその構造を CLF の蓄積により可視化した (図①- (2A)-2.10)。

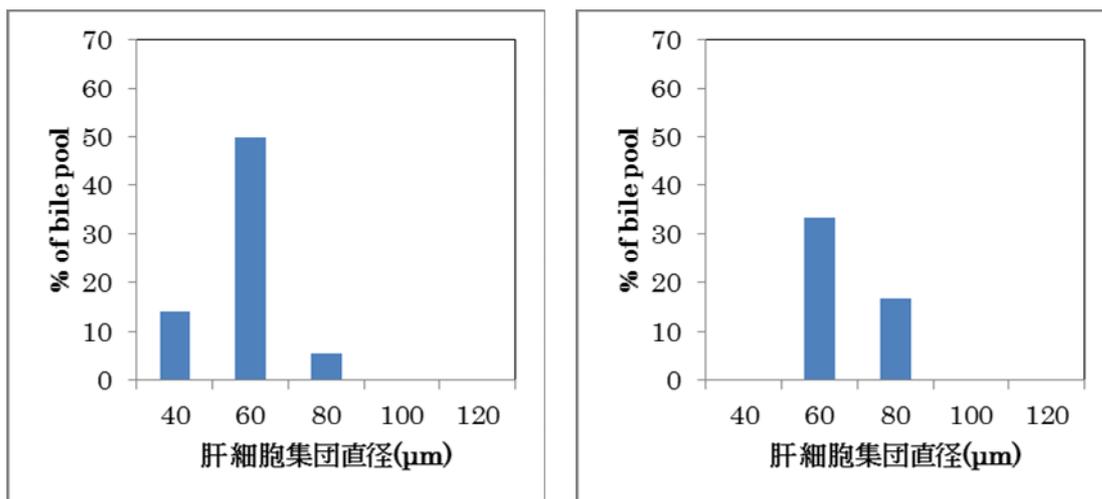
このようにして得た明視野画像と蛍光画像から、円形マイクロパターンに配置された肝細胞集団の直径と、その内部に作成された毛細胆管の直径を計測した (図①- (2A)-2.11)。2 回の実験とも、直径約 60 μm のマイクロパターン内に肝細胞を配置したときに、直径 40-120 μm の範囲内ではもっとも太い毛細胆管が作成された。直径 20 μm 以上の毛細胆管を胆汁蓄積部と規定すると、直径約 60 μm のマイクロパターン内に肝細胞を配置したときに胆汁蓄積部のできる確率がもっとも高かった (図①- (2A)-2.12)。



図①- (2A)-2.10 円形マイクロパターン化された肝細胞に形成された毛細胆管構造。
上段左からマイクロパターン円直径 60 μm , 80 μm 、下段左からマイクロパターン円直径 100 μm , 120 μm の場合。



図①- (2A)-2.11 円形マイクロパターン化された肝細胞に形成された毛細胆管径 (2 回の実験結果を示す。)



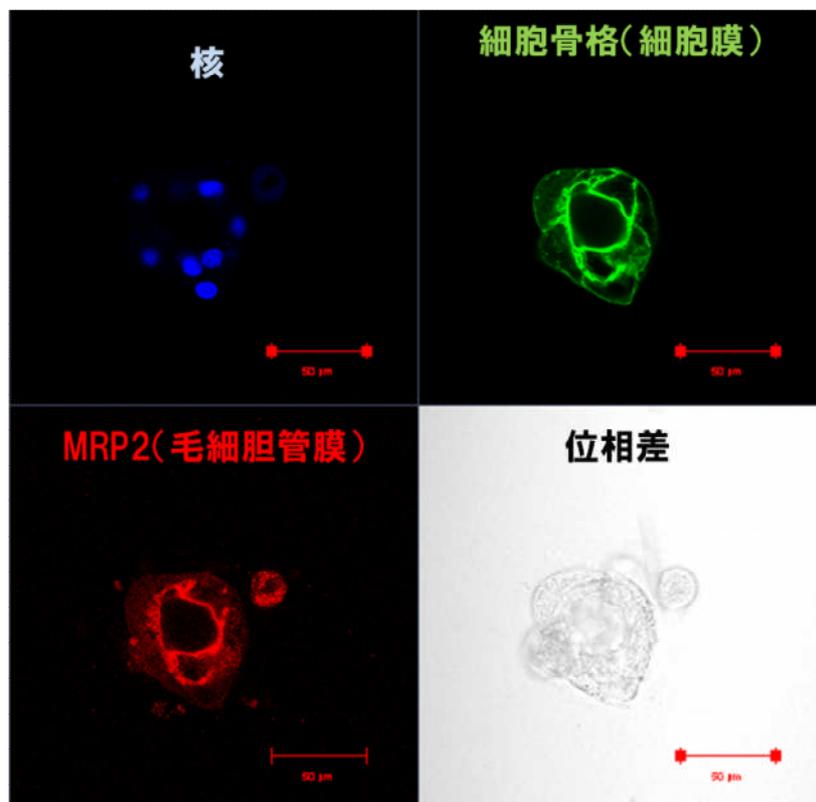
図①- (2A)-2.12 円形マイクロパターン化された肝細胞に形成された径 20μm 以上の毛細胆管割合 (2 回の実験結果を示す。)

d. 毛細胆管膜マーカータンパク MRP2 の発現局在解析による毛細胆管構造解析

毛細胆管は毛細胆管膜と呼ばれる特殊な細胞膜構造に囲まれた構造をしている。毛細胆管膜には MRP2 と呼ばれる毛細胆管膜マーカータンパクが発現しているため、MRP2 を染色することで、毛細胆管構造を可視化することができる。形成された肝細胞組織の構造および毛細胆管構造を明らかにするため、上記で直径 60μm 円形マイクロパターン化コラーゲンゲルに配置された肝細胞の MRP2 を抗体で染色した。細胞膜は細胞膜に多く局在するアクチンを染色した。

細胞数を明確にするため、細胞核を DAPI によって染色した。このように染色された細胞を共焦点顕微鏡を用いて観察し、3次元構造を構築した

直径 60 μm 円形マイクロパターンコラーゲンゲルに配置されたこの肝細胞は 10 個で構成されていた。高さ方向の細胞の重なりかたから、この細胞集団は多層にはなっていないが、核の高さ方向の位置から、細胞が互い違いに重なった構造となっている。厚さは約 40 μm であった。これらの肝細胞が寄り集まって、その内側に直径約 30 μm の毛細胆管腔を形成している (図①-(2A)-2.13)。



図①-(2A)-2.13 円形マイクロパターン化された肝細胞に形成された毛細胆管構造

(2A)-2-2-4 結論

a. 実施項目

細胞の空間的配置の制御等により毛細胆管構造などの微細組織構造を誘導する手法選定に関する指針を得る。

【結果】

コラーゲンゲル表面に線形および円形の窪みを作製し、この窪み内に肝細胞を配置するプロセスを検討した。そして、このコラーゲンゲル表面の線形の窪みの幅や円形の窪みの直径を様々に変えることで、初代肝細胞の配置範囲を制

御した。このようにして、肝細胞をある一定の範囲内に限定して配置した時に、形成された毛細胆管の配向や位置、形状を制御することができることを示した。

(2A)-2-3 実証/基盤技術研究 (H23-H24)

(2A)-2-3-1 最終目標

「毛細胆管構造などの微細組織構造を再構成するプロセスを開発し、少なくとも1つの典型基質由来代謝物を蛍光光度等を用いて測定し、定量可能な代謝物量を抽出できる細胞の配置や添加物、培養日数を決定する。

さらに、薬物動態試験デバイスの実用化に求められる性能の一つである、微細組織の代謝酵素およびトランスポータの遺伝子量を明らかにする。」

節(2A)-2-3-2で、少なくとも1つの典型基質由来代謝物を蛍光光度等を用いて測定し、定量可能な代謝物量を抽出できる「添加物、培養日数」の決定について述べる。

節(2A)-2-3-3で、少なくとも1つの典型基質由来代謝物を蛍光光度等を用いて測定し、定量可能な代謝物量を抽出できる「細胞の配置」の決定について述べる。

節(2A)-2-3-4で、定量可能な代謝物量を抽出できることを実証した結果を示す。

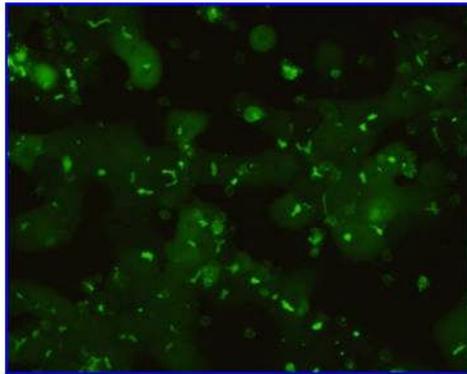
節(2A)-2-3-5で、代謝酵素およびトランスポータの遺伝子量について報告する。

(2A)-2-3-2 ガス透過性プレートによるヒト肝細胞胆汁排泄活性の増強実証

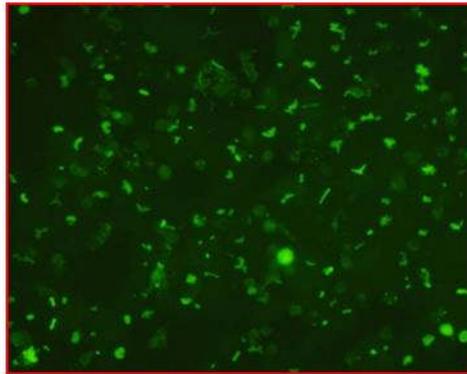
ガス透過性フィルムを張った24穴細胞培養プレートを作成し、コラーゲンコートを実施したその表面上でヒト肝細胞を培養し、Digoxin, Estradiol-17 β -glucuronide, Taurocholateの3種類の化合物を用いて、胆汁排出活性を測定した。比較対照として、市販されているコラーゲンコート済みのプラスチック（ポリスチレン）製24穴細胞培養プレートを用いた。

ヒト肝細胞はCelsis IVT社の凍結接着細胞（lot: IZT）を用いた。ヒト肝細胞はマトリゲル含有培地で5日間培養した。3日目および5日目にCDFDAを毛細胆管に取り込ませ、蛍光顕微鏡を用いて毛細胆管の形成の様子を可視化した（図①-(2A)-2.14）。一方、同時にDigoxin, Estradiol-17 β -glucuronide, Taurocholateを用いて、Liuら(1999)の方法により胆汁排出活性を測定した（図①-(2A)-2.15、図①-(2A)-2.16）。

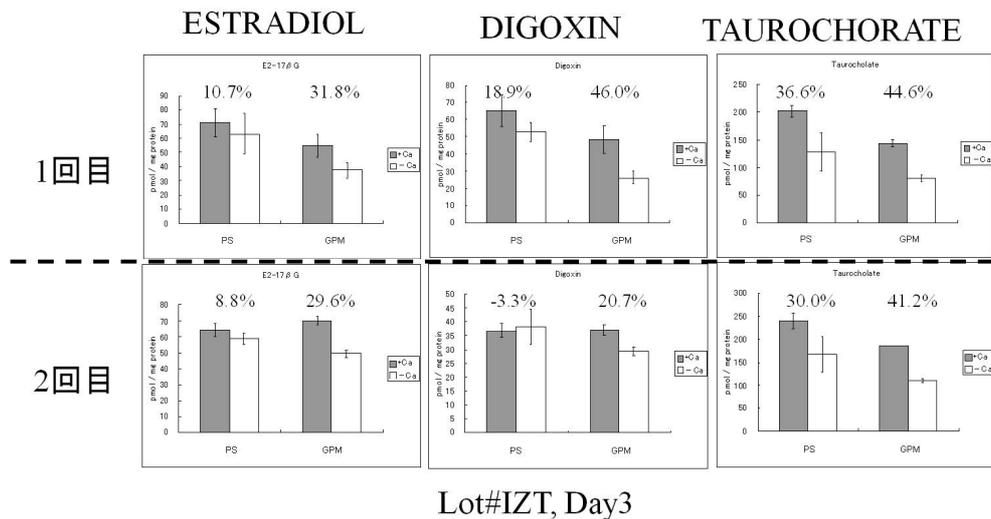
PSプレート



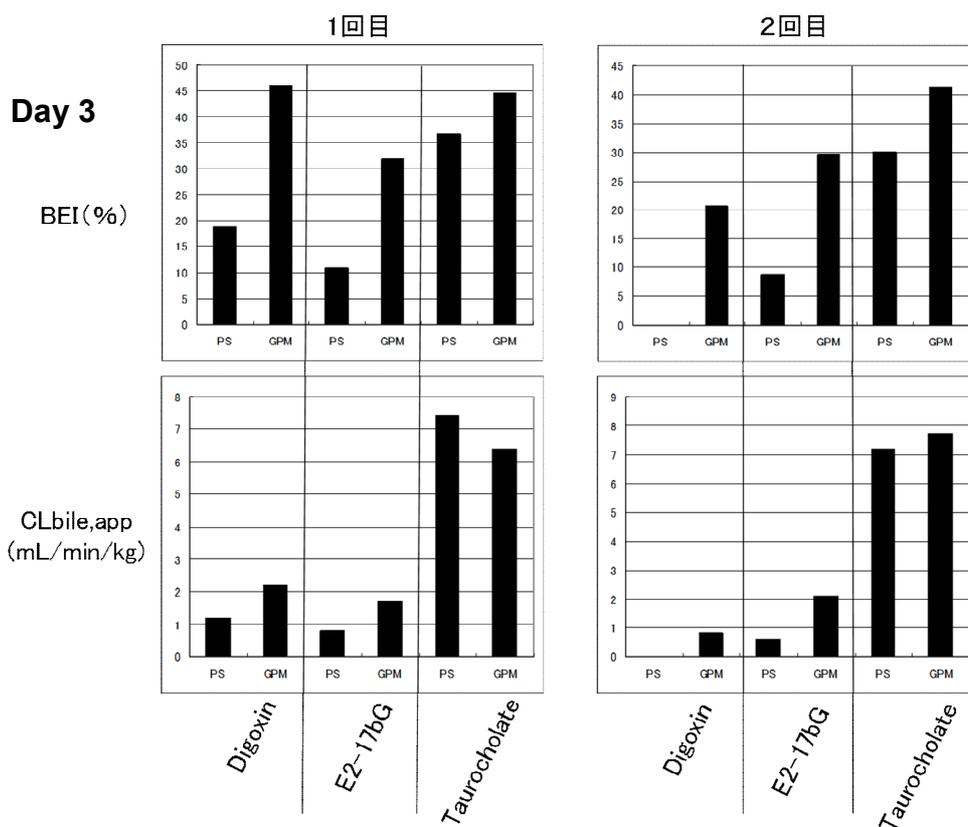
ガス透過性プレート



図①-(2A)-2.14 CDFDA 染色を用いた従来のポリスチレンプレート (左) およびガス透過性プレート (右) 上での肝細胞における毛細胆管形成の様子



図①-(2A)-2.15 従来のポリスチレン (PS) プレートおよびガス透過性膜 (GPM) プレート上で3日間培養した肝細胞の化合物蓄積量 (黒:カルシウム、マグネシウムイオンありのバッファで処理した肝細胞の化合物蓄積量、白:カルシウム、マグネシウムイオンなしのバッファで処理した肝細胞の化合物蓄積量)



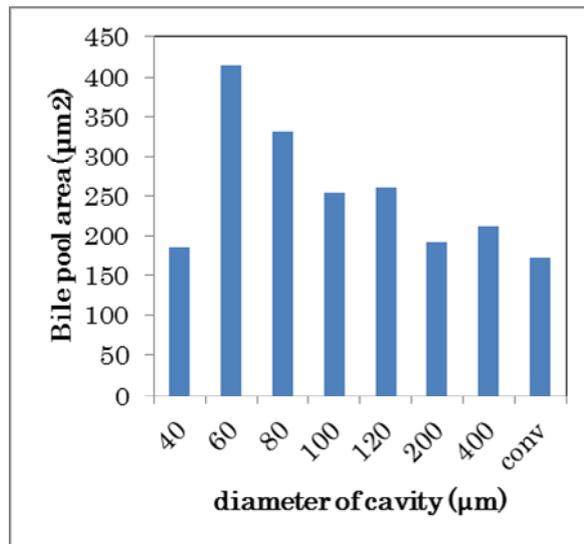
図①-(2A)-2.16 図①-(2A)-2.15の結果から算出した、従来のポリスチレン (PS) プレートおよびガス透過性膜 (GPM) プレート上で3日間培養した肝細胞の胆汁排出活性 BEI および胆汁クリアランス値

(2A)-2-3-3 円型窪みの面積、深さの決定

H22 年度までの検討で、コラーゲンゲルで形成した微小窪みを用いて、線型および円型に肝細胞を制御して配置することができた。さらに、窪みの形状、大きさを変えることで、毛細胆管の長さや面積を制御できることを明らかにした。

H23 年度はこれらの検討結果に基づき、毛細胆管から胆管代謝物を直接吸引して、分析するため、毛細胆管面積を最大化するような、円形溝の面積および深さの決定を行った。

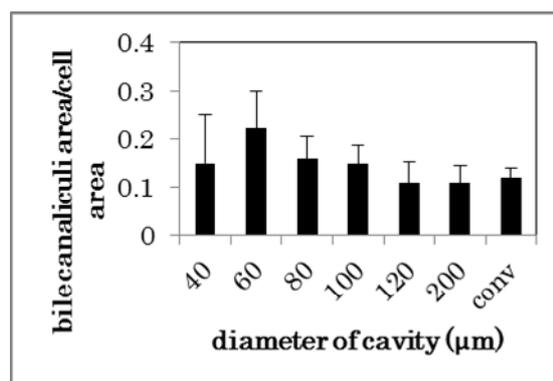
まず、コラーゲンゲルと PDMS スタンプを用いて、深さ 100 μ m 直径 40~400 μ m の範囲の円型窪みをコラーゲンゲル上に作成し、胆管面積を最大化するコラーゲンゲル円型窪みの直径の決定を行った。前章の方法に従って肝細胞を窪み内に配列した。播種後 48 時間後、共焦点顕微鏡で CLF が蓄積した毛細胆管を認識後、その毛細胆管面積を AxioVision により計算した (図①-(2A)-2.17)。



図①-(2A)-2.17 コラーゲンゲル窪みの直径による胆汁だまり面積変化

深さ 100μm の円型コラーゲンゲル窪みにおいては、胆管面積は直径 60μm が極大となった。また、従来法に比べて、直径 60 および 80μm では有意に胆管面積が大きくなった。

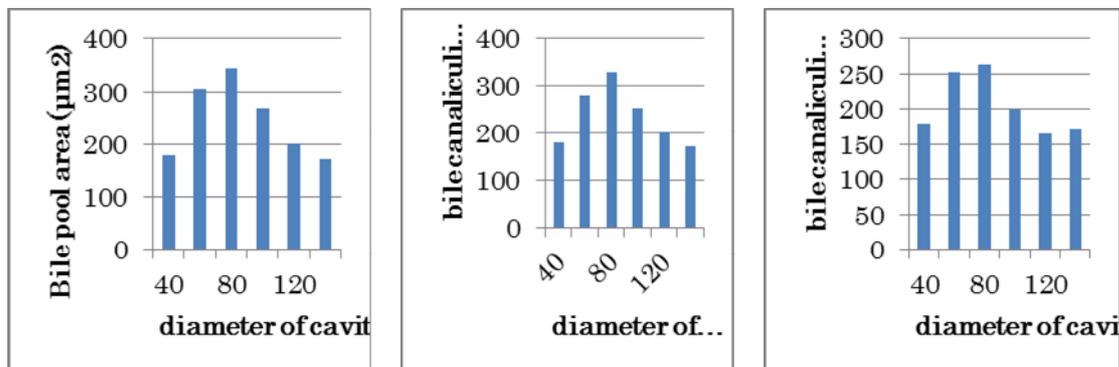
胆管面積と細胞面積から算出した胆汁排出活性により評価をした（図①-(2A)-2.18）。その結果、同様に深さ 100μm の円型コラーゲンゲル窪みにおいては、胆管面積は直径 60μm が極大となった。また、従来法に比べて、直径 60 および 80μm では有意に胆管面積が大きくなった。



図①-(2A)-2.18 コラーゲンゲル窪みの直径による胆汁排出活性変化

次に、コラーゲンゲルと PDMS スタンプを用いて、深さ 100, 150, 200μm 直径 40~120μm の範囲の円型窪みをコラーゲンゲル上に作成し、胆管面積を最大化するコラーゲンゲル円型窪みの深さの決定を行った。前章の方法に従って肝細胞を窪

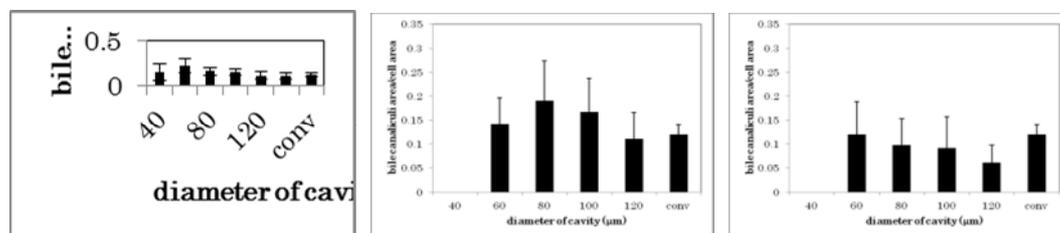
み内に配列した。播種後 48 時間後、共焦点顕微鏡で CLF が蓄積した毛細胆管を認識後、その毛細胆管面積を AxioVision により計算した (図①- (2A)-2.19)。



図①- (2A)-2.19 コラーゲンゲル窪みの直径と深さによる胆汁だまり面積変化 (左から深さ 100μm、150μm、200μm)

深さ 100, 150, 200μm の円型コラーゲンゲル窪みにおいては、胆管面積は直径 60μm および 80μm が極大となる傾向は変わらなかった。また、溝が深くなるにつれて、検出される毛細胆管面積は減少する傾向が見られた。

胆管面積と細胞面積から算出した胆汁排出活性により評価をした (図①- (2A)-2.20)。その結果、深さ 100μm の円型コラーゲンゲル窪みにおいては、胆管面積は直径 60μm が極大となり、深さ 150μm の円型コラーゲンゲル窪みにおいては、胆管面積は直径 80μm が極大となった。また、深さ 100μm の円型コラーゲンゲル窪みにおいては、従来法に比べて有意に胆汁活性が高かったが、深さ 150 および 200μm の円型コラーゲンゲル窪みにおいては、従来法に比べて有意な胆汁活性上昇が見られなかった。



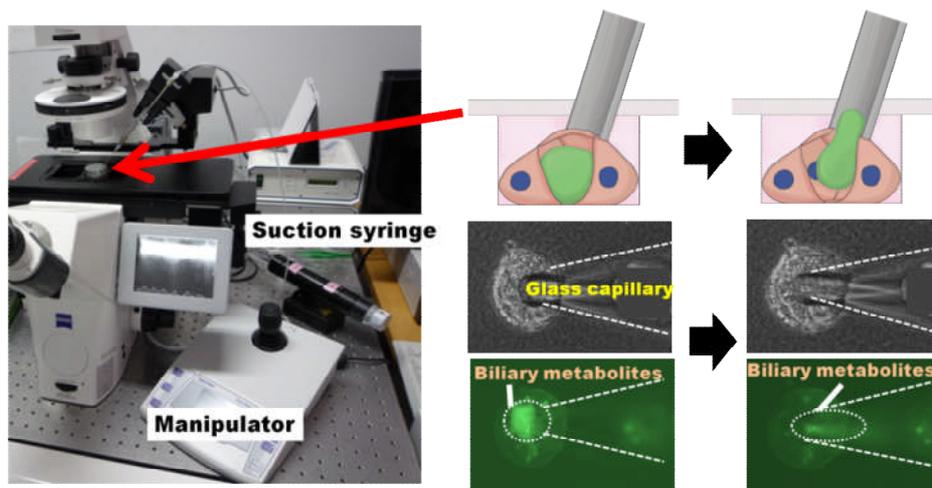
図①- (2A)-2.20 コラーゲンゲル窪みの直径と深さによる胆汁排出活性変化 (左から深さ 100μm、150μm、200μm)

これらの結果から、胆管から直接代謝物を吸引回収するには、深さ 100 μm 直径 60~80 μm の円型コラーゲン窪みを用いて、肝細胞を配列することが最適であると言える。

(2A)-2-3-4 胆管代謝物の直接抽出の実証

a. CLF の直接回収と定量

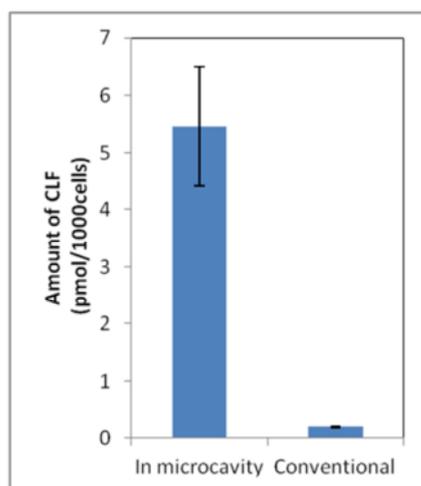
培養を HBSS バッファで 2 回洗浄した。1 μM cholyl-lysyl-fluorescein (CLF)(BD Bioscience 社製) in HBSS で 30 分間、37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 で培養した。HBSS バッファで 2 回洗浄した。その後、内径およそ 10~20 μm のガラスキャピラリとオイルインジェクターを連結した。さらにそれをマイクロマニピレーター(Eppendorf 社製)に装着した。これを用いて、ガラスキャピラリを巨大胆管に接触させた。オイルインジェクターを吸引側に操作して、巨大胆管の内容物のみを吸引した。CLF の蛍光により胆管代謝物がガラスキャピラリ内に回収できることを視覚的に実証した (図①-(2A)-2.21)。



図①-(2A)-2.21 胆汁だまりからの CLF 直接抽出の様子

従来サンドイッチ培養の毛細胆管からの胆管代謝物抽出は以下のように行われた。培養を HBSS バッファで 2 回洗浄した。1 μM CLF in HBSS で 30 分間、37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 で培養した。37 $^{\circ}\text{C}$ の CO_2 インキュベータで 15 分間インキュベート。アスピレーターで除去。HBSS バッファで 2 回洗浄。Ca/Mg $^{2+}$ -free HBSS バッファを注ぐ。37 $^{\circ}\text{C}$ の CO_2 インキュベータで 15 分間インキュベート (この間に胆管代謝物が溶液中に溶出されると考えられるが、血管側に排出される代謝物、ゲルに吸着した CLF も溶出される。) し、その液を回収した。

回収した CLF 量を蛍光量から定量した。定量には微量溶液中代謝物測定装置を用いた。一方、従来サンドイッチ培養の胆管代謝物を抽出し、同時に測定して比較した。代謝物量は、抽出に用いた細胞数で標準化した(図①-(2A)-2.22)。従来法に比べて、パターン化肝細胞からは約 27 倍の代謝物が得られた。

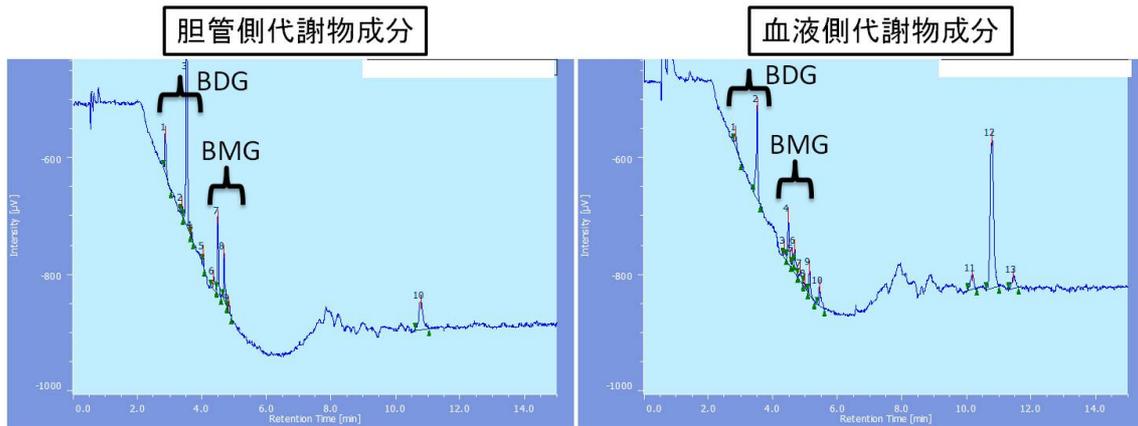


図①- (2A)-2.22 胆汁だまりから直接抽出した CLF (左) と従来培養から従来方法により抽出した CLF 量

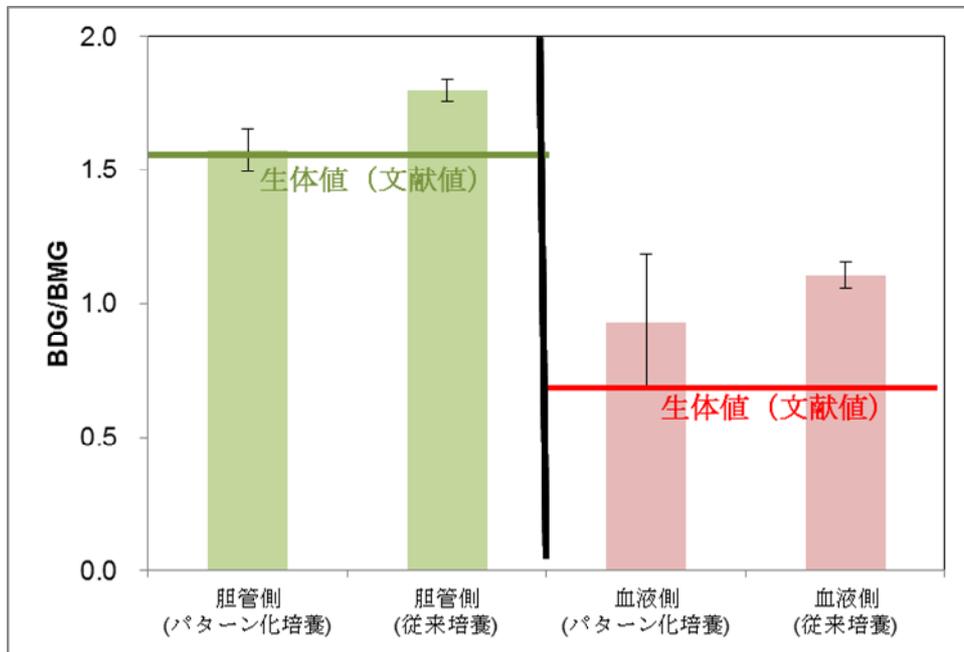
b. ビリルビン代謝物の直接抽出と分析

肝臓の薬物代謝分析のモデルの一つとして、ビリルビン代謝物の分析を行った。前章の方法に従ってビリルビン代謝物をガラスキャピラリーを用いて直接吸引した。抽出した液を HPLC を用いて、ビリルビン代謝物であるモノグルクロン酸ビリルビン(BMG)とジグルクロン酸ビリルビン(BDG)を分離、定量した(図①-(2A)-2.23)。

代謝物の量は HPLC 分析によって決定した。クロマトグラフィは Merck 社製 Chromolith Performance RP 18e カラムを装備した日本分光社製の LC-2000plus システムにより行った。ビリルビン代謝物であるグルクロン酸ビリルビンを分離するために、移動相 A (75% 0.01M リン酸ナトリウム、25% アセトニトリル、150 μ L/L トリエチルアミン) と移動相 B(20% リン酸ナトリウム、80%アセトニトリル、1.5mL/L トリエチルアミン)の濃度勾配を用いた。まず、1 分間 100% 移動相 A で分離した後、6 分で 100%移動相 B となる濃度勾配分離を行った。ビリルビン代謝物であるモノグルクロン酸ビリルビン(BMG)、ジグルクロン酸ビリルビン(BDG)を 450nm の吸光度で検出した。流速は 3mL/min で行った。



図①-(2A)-2.23 パターン化肝細胞から得られたビリルビン代謝物の HPLC 結果



図①-(2A)-2.24 HPLC 結果から算出した BDG、BMG 量比のパターン化培養、従来培養、生体値との比較

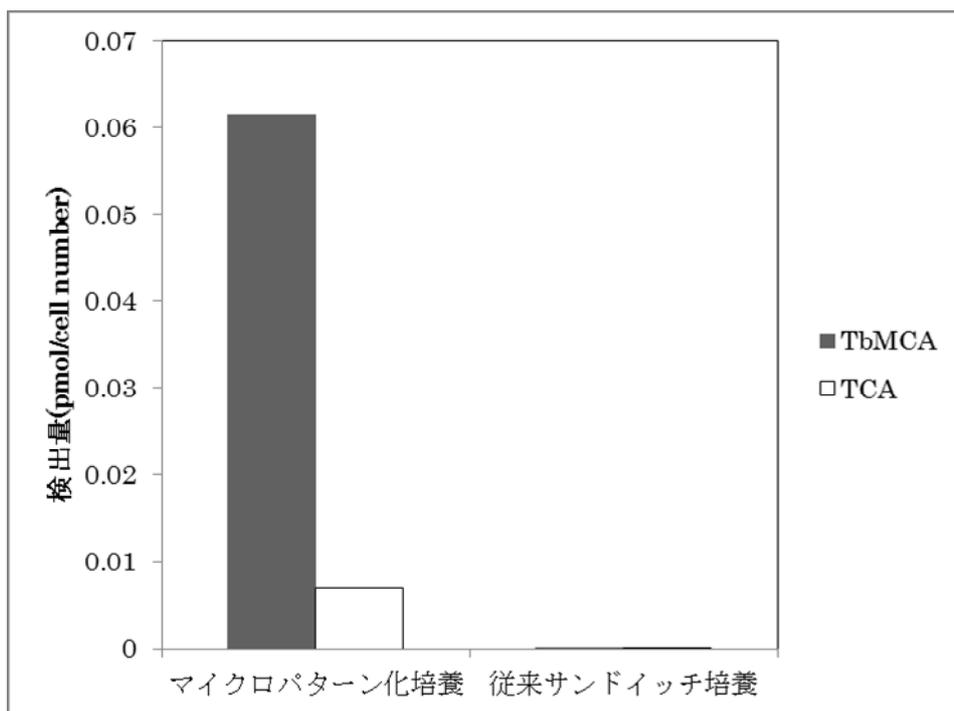
この結果から、BMG、BDG の量比 BDG/BMG を計算したところ、胆管中成分では 1.63、反応液中成分は 0.77 であった。Mesa らの報告によると、ラット生体の胆汁中と血液中の BDG/BMG はそれぞれ 1.5 および 0.6 である。このことから、培養肝細胞から得たビリルビン代謝物とラット生体から得たビリルビン代謝物の成分はほぼ同等であるといえる (図①-(2A)-2.24)。したがって、当該技術を用いれば生体を用いずに生体の代謝物成分を正確に予測できることを実証できた。

c. 内在性胆汁酸の直接抽出と分析

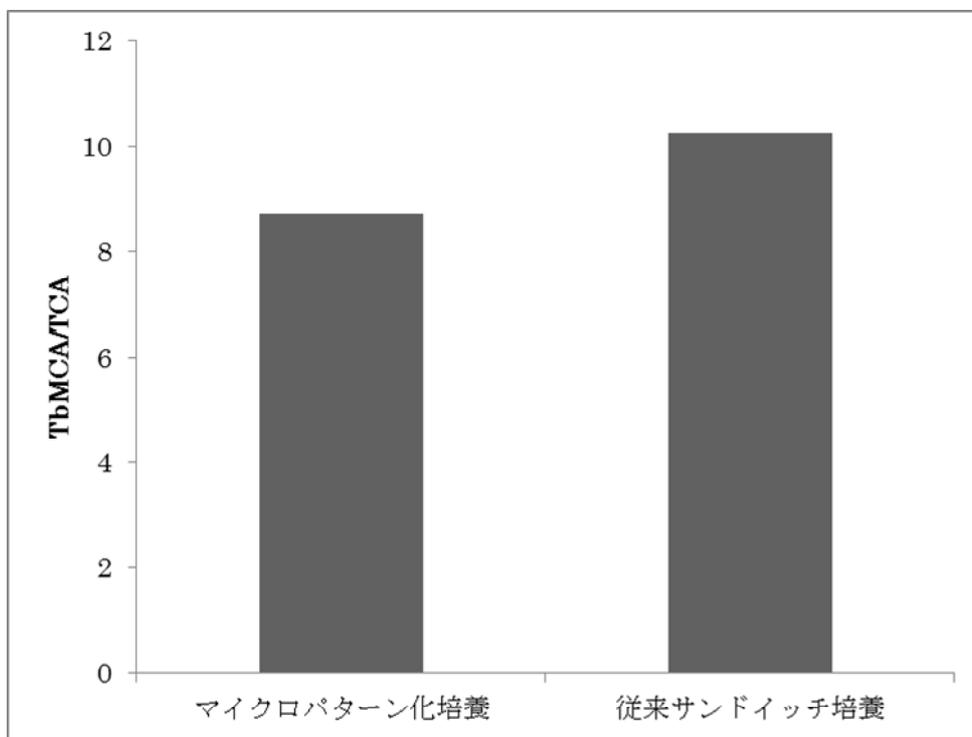
もう一つの肝臓での薬物代謝のモデルとして内在性胆汁酸の分析を行った。培養2日目のマイクロパターン培養の胆汁だまりから、前章の方法に従って胆汁酸をガラスキャピラリーを用いて直接吸引した。抽出した液中に含まれる胆汁酸をLC-MS/MSを用いて分離定量し、26種類の胆汁酸について分析を行った。

表①-(2A)-2.2 パターン化培養から得られた胆汁酸濃度

胆汁酸分画測定		(定量下限以下含む)	
胆汁酸	略号		
		培地成分	胆管内成分
リトコール酸	LCA	-	0.006539
12-ケトリトコール酸	KLCA	-	-
ウルソデオキシコール酸	UDCA	-	-
ヒオデオキシコール酸	HDCA	-	-
ケノデオキシコール酸	CDCA	-	-
デオキシコール酸	DCA	-	-
α -ムリコール酸	aMCA	-	0.001635
β -ムリコール酸	bMCA	0.003821	0.004517
コール酸	CA	0.0005458	-
グリコリトコール酸	GLCA	-	-
グリコウルソデオキシコール酸	GUdCA	0.005094	-
グリコヒオデオキシコール酸	GHdCA	-	-
グリコケノデオキシコール酸	GCdCA	0.004105	0.0006383
グリコデオキシコール酸	GDCA	-	-
グリコヒオコール酸	GHCA	0.001036	0.001159
グリココール酸	GCA	0.04545	0.005190
タウロリトコール酸	TLCA	0.001949	0.002284
タウロウルソデオキシコール酸	TUdCA	0.009639	0.002613
タウロヒオデオキシコール酸	THdCA	0.0008188	-
タウロケノデオキシコール酸	TCdCA	0.01499	0.003771
タウロデオキシコール酸	TDCA	0.001109	0.001691
タウロ- β -ムリコール酸	TbMCA	4.641	0.7260
タウロヒオコール酸	THCA	0.005123	0.003352
タウロコール酸	TCA	0.6863	0.09721
検量線範囲: 0.01-30nmol/mL (KLCA: 0.03-10nmol/mL, CA: 0.01-10nmol/L)			



図①- (2A)-2.25 パターン化培養と従来培養法におけるタウロβムリコール酸とタウロコール酸抽出効率



図①- (2A)-2.26 パターン化培養と従来培養法におけるタウロβムリコール酸とタウロコール酸量比

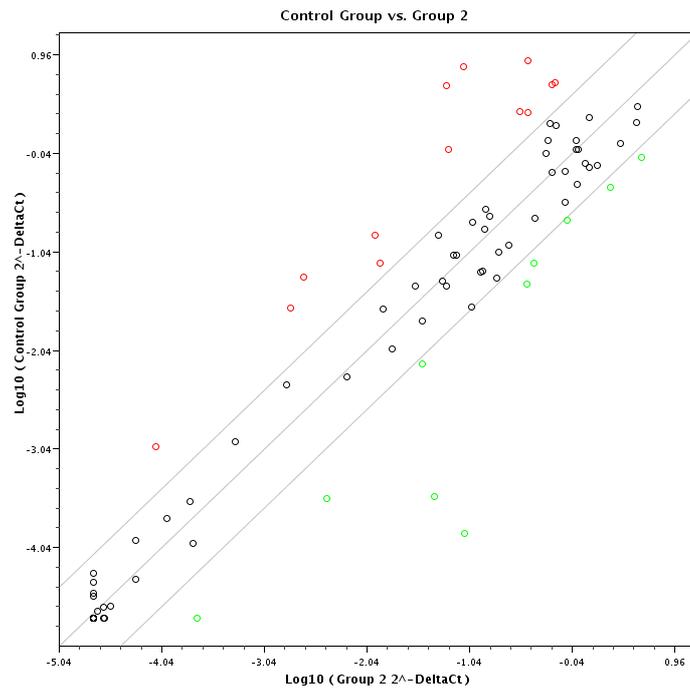
表①-(2A)-2.2 に示すように、定量下限以下のものも含めて、複数の胆汁酸成分が検出できた。特に、タウロβムリコール酸、タウロコール酸が多量に検出できた。これらは、生体においても主要な成分であることが知られている。したがって、マイクロパターン培養の胆汁だまりに排出される胆汁酸は、生体に近い状態であることが示唆された。さらに、図①-(2A)-2.25 に示すように、従来のサンドイッチ培養と抽出方法による分析に比べて、劇的に量が増加していた。一方、成分比は、従来培養とマイクロパターン化培養ではほとんど変わらなかった(図①-(2A)-2.26)。したがって、胆汁酸に関しては、従来方法に対して、回収量が多くなるという優位性が言える。

d. 薬物トランスポータおよび薬物代謝酵素遺伝子の発現量

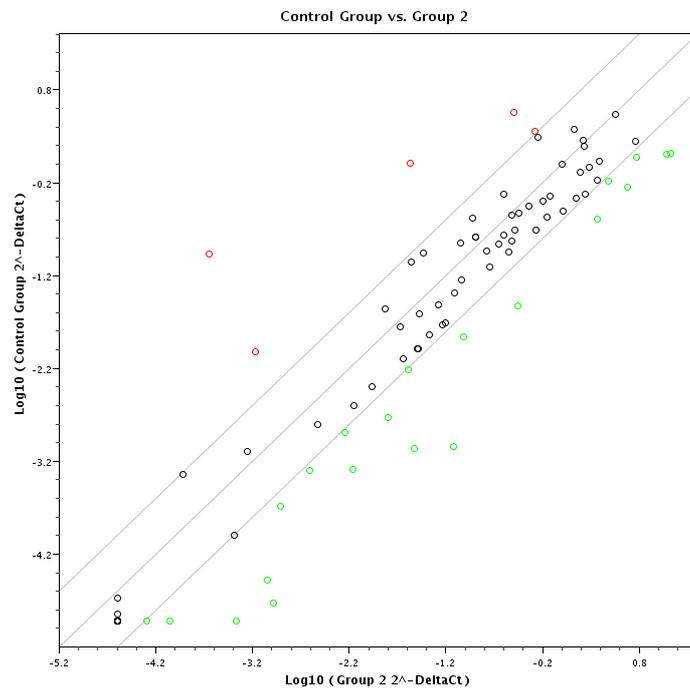
Multi Drug Resistant Protein (Mrp)などのABC薬物トランスポータ機能やCYPなどの薬物代謝機能は、薬物代謝や薬物毒性を予測する上で重要な因子である。これらの機能を類推する上で、これらの遺伝子群の発現量を測定することが最も簡便かつ信頼されている方法である。肝細胞の培養プロセスにおいて、これらの遺伝子群の発現量は、肝細胞培養の過程や処理により大きく変動する。そこで、前述の過程で確立されたマイクロパターン化培養において、薬物トランスポータおよび薬物代謝遺伝子の発現量を定量することにした。

ラット肝臓から調製したばかりの肝細胞を Fresh hepatocyte として、培養2日目および4日目に抽出したRNAを用いてそれぞれの遺伝子群の発現量をリアルタイムPCR法を用いて定量した。定量に用いたPCRアレイはキアゲン社製のRT2 profiler PCR ArrayのRat Drug Metabolism: Phase I Enzyme, Rat Drug Metabolism: Phase II Enzyme, Rat Drug Transportersを用いた。解析に含まれる遺伝子のリストはQiagen社のホームページなどを参照されたい。

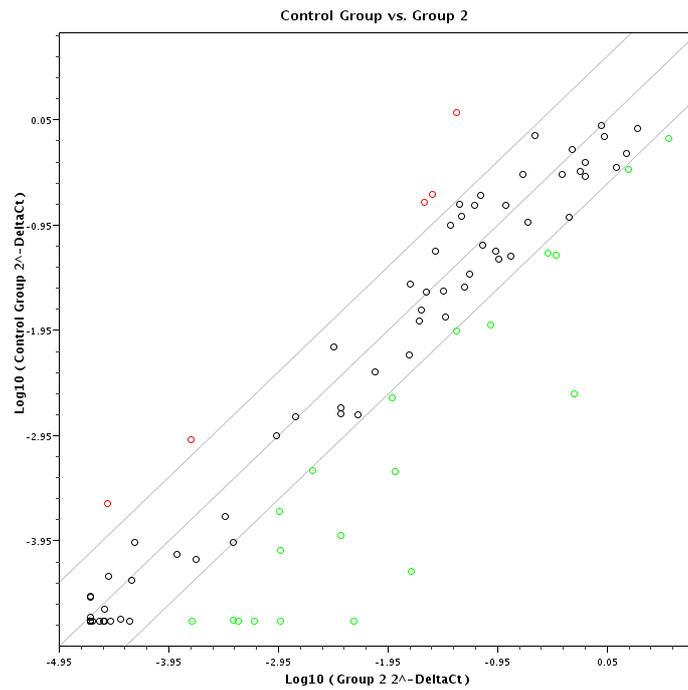
PCR反応にはApplied Biosystems社製のStepOne PCRユニットを用いた。データ解析はRT2 profiler PCR Array Data Analysis Version 3.5を用いて行った。Fresh Hepatocyteと比較して相対的にどのように変化したかで示した(図①-(2A)-2.27、図①-(2A)-2.28、図①-(2A)-2.29)。



図①-(2A)-2.27 第一相薬物代謝酵素 (Fresh vs マイクロパターン培養)

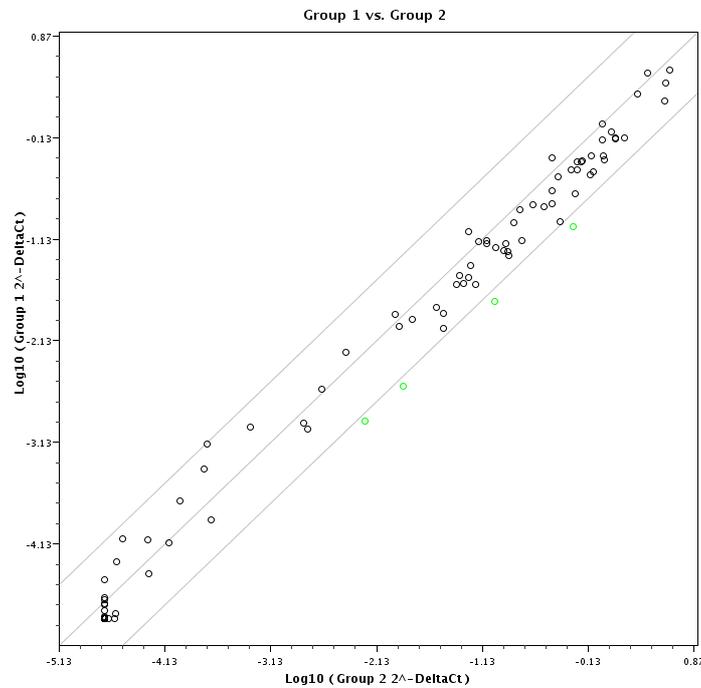


図①-(2A)-2.28 第二相薬物代謝酵素 (Fresh vs マイクロパターン培養)

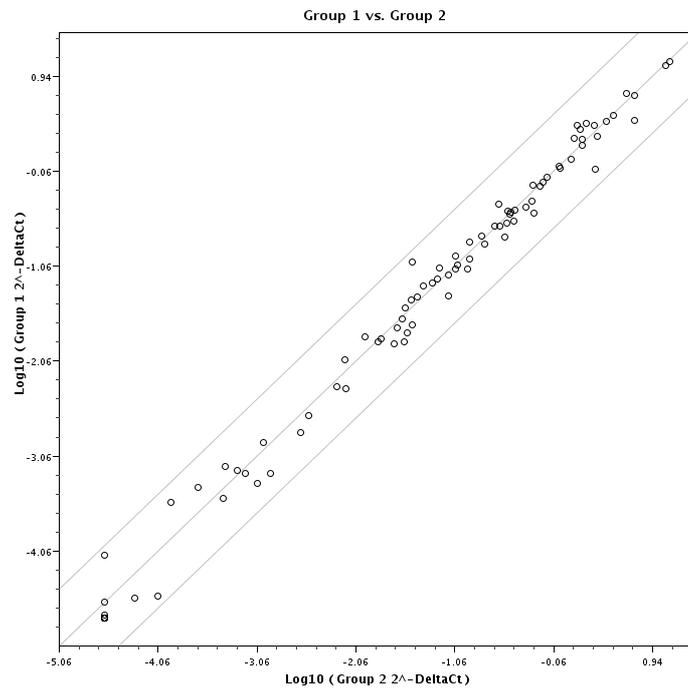


図①-(2A)-2.29 薬物トランスポータ (Fresh vs マイクロパターン培養)

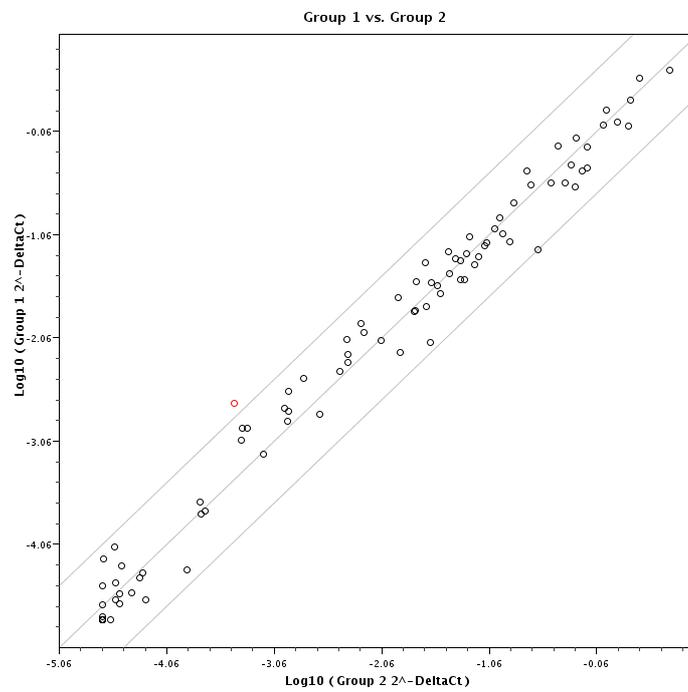
Fresh hepatocyte (Group1)とマイクロパターン化培養(Group2)で比較すると、第一相薬物代謝酵素遺伝子群と薬物トランスポータ遺伝子群の発現量が、マイクロパターン培養で高い傾向がみられた。



図①-(2A)-2.30 第一相薬物代謝酵素
(サンドウィッチ培養 vs マイクロパターン培養)



図①-(2A)-2.31 第二相薬物代謝酵素
(サンドウィッチ培養 vs マイクロパターン培養)



図①-(2A)-2.32 薬物トランスポーター
(サンドウィッチ培養 vs マイクロパターン培養)

図①- (2A)-2.30 から図①- (2A)-2.32 で示すように、サンドウィッチ培養 (Group1)とマイクロパターン化培養(Group2)で比較すると、第 1 相薬物代謝酵素の発現量が、マイクロパターン化培養でやや高いが、全体的には従来法とほぼ同等の遺伝子発現量であった。

(2A)-2-3-5 結論

a. 実施項目

毛細胆管構造などの微細組織構造を再構成するプロセスを開発し、少なくとも 1 つの典型基質由来代謝物を蛍光光度等を用いて測定し、定量可能な代謝物量を抽出できる細胞の配置や添加物、培養日数を決定する。

さらに、薬物動態試験デバイスの実用化に求められる性能の一つである、微細組織の代謝酵素およびトランスポータの遺伝子量を明らかにする。

b. 結果

ガス透過性膜およびコラーゲンゲル表面に形成した直径約 70 μm の円柱形の大きさの微細な窪みに肝細胞を配列し、マトリゲル添加された培養培地中で 2 日間培養することにより、3 次元的な肝細胞組織を形成させることに成功し、その内部に形成される毛細胆管構造の形状や体積を制御することができた。このようにして最適化して形成した毛細胆管の内部から、ビリルビン代謝物、および胆汁酸の成分および量を HPLC および LC-MS/MS により分析することに成功した。

上記、肝細胞組織の薬物トランスポータ 84 種類、薬物代謝酵素 168 種類の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により測定し、生体肝臓および既存肝細胞培養法のそれとの相対的な遺伝子量を明らかにした。

(2A)-2-4 まとめ

(2A)-2-4-1 胆汁排出活性の高い肝細胞培養の作製

医薬品候補物質の胆管への代謝物排出や内在性因子の胆管排出に対する影響を解析するため、肝細胞を用いた毛細胆管形成培養が開発され、利用されてきている。従来のもので代表的な方法は、プラスチック平面上で平面的に培養した肝細胞にコラーゲンゲルやマトリゲルを重層して培養するサンドイッチ培養法がある。しかしながら、この方法では、毛細胆管が効率よく作製されないため、胆管代謝物の輸送を感度良く検出事ができなかった。輸送が感度良く検出できないため、その輸送に対する影響を解析することはさらに難しく、実用化されていない。

本プロジェクトで開発した、PDMS 膜を用いたガス透過性膜肝細胞培養プロセスを活用することで、ガス透過性膜を張った細胞培養器の開発が可能である。この器材を用いて、肝細胞に迅速に活性の高い機能性毛細胆管をもつ肝細胞を作製することができる。これを用いれば、肝臓におけるさまざまな医薬品候補物質などの肝臓における細胞間輸送を、動物を用いずに微量の試験物質で早期に精度よく予測するサービスなどに活用することができるようになるため、創薬効率の上昇に貢献できる。このような細胞培養器は大量生産が可能で、輸送性、保存性も高いため、世界中の培養細胞を行う研究者や化学・製薬企業等によって利用されることが期待できる。一方、ラットなどのげっ歯類の肝細胞だけでなく、ヒト肝細胞でも適用できることが示され、上記の予測をヒトに対して行うことができることになる。1 か月程度の長期培養が可能であれば、薬物輸送に関わる解析だけでなく、肝毒性に対する効果の試験サービスにも用いることも可能となる。4 日を超える長期的な培養に対して本プロジェクトでは未検討であったので、今後、長期的な培養による肝細胞機能の解析を通して、長期的な培養のための適切なプロセスを開発しなければならない。一方、肝細胞だけでなく、酸素要求性の高い神経細胞や心筋細胞など汎用性高く様々な細胞の機能に対して、機能の向上に寄与する可能性がある。

(2A)-2-4-2 胆管代謝物の直接抽出分析可能な肝細胞培養の作製

肝臓での生成代謝物、輸送量や輸送速度、輸送の割合といった薬物動態解析は、ほとんどの場合、動物を用いて行われてきた。しかしながら、薬物動態に関わる、薬物代謝活性や遺伝子種、遺伝子発現量などは、動物とヒトの間では種差が大きいことが知られており、ヒト細胞の使用を念頭とした、細胞を用いた薬物動態解析システムが求められている。従来のもので代表的な方法は、プラスチック平面上で平面的に培養した肝細胞にコラーゲンゲルやマトリゲルを重層して培養するサンドイッチ培養法がある。しかしながら、この方法では、毛細胆管が効率よく作製されないため、極性輸送された物質成分を解析するデバイス・システム・方法は開発が求められている。

本プロジェクトで開発した肝細胞の配列プロセスは、比較的安価で簡単に、そして非常に微細な範囲（直径 50 μ m 前後）への細胞の配列方法を提供する。これと同じレベルの細胞配列を一般的なマイクロ流路や市販の細胞ディスペンサーを用いて行うことは煩雑かつ困難であり、コストも高い。さらに、本プロセスは簡単で迅速性が高いので、扱いやすいが機能性に乏しい細胞株だけでなく、繊細で生

存が難しいが機能性の高い初代肝細胞の細胞配列にも適用することができる。これにより、生体の肝臓の機能に近い状態を維持したままの肝細胞培養を作製することができる。本プロセスによって、肝細胞培養に形状と位置を制御して毛細胆管を形成させることができるようになった。そして、動物実験と同じように、胆管から胆管代謝物を抽出し、その物質の成分や量を分析することができた。これにより、動物やヒトを用いずに、医薬品候補化合物などの体内での代謝や輸送を予測することができる。このようなことを可能にするデバイスの波及効果として、より迅速で低コストでの新薬開発への貢献が考えられる。今後は、細胞配列→薬物添加→代謝物抽出→分析、の流れを迅速・簡便化するため、デバイスやシステムの開発へ発展させていく。これにより、研究者や製薬関連だけでなく、多くの人々の健康・医療に貢献することができると考えている。

参考文献

Liu X, LeCluyse EL, Brouwer KR, Gan LS, Lemasters JJ, Stieger B, Meier PJ, and Brouwer KL (1999b) Biliary excretion in primary rat hepatocytes cultured in a collagen-sandwich configuration. *Am J Physiol* **277**: G12-21.

Mesa VA, De Vos R, and Fevery J (1997) Elevation of the serum bilirubin diconjugate fraction provides an early marker for cholestasis in the rat. *J Hepatol* **27**:912-916.