

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12526

研究課題名(和文) 開閉能を有した管状人工消化管マイクロマシンとその薬効評価応用

研究課題名(英文) An openable tubular artificial gastrointestinal micromachine for medicine effect evaluation

研究代表者

小西 聡 (konishi, satoshi)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：50288627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、薬効評価のための開閉能を有した管状人工消化管(腸管)の実現に取り組んだ。MEMS技術により実現した細胞培養基材構造は、平板形状と円管形状を可逆的に変換可能であり、灌流時と観察時に切り替え可能である。基本性能に加え、薬剤評価の高効率化を目指し、基板中に薬液灌流流路と駆動圧力流路を集積化するなど操作の高効率化を図った。また、灌流液の漏れ防止や灌流条件制御といった点でも成果を得た。実現した人工消化管マイクロマシン上に細胞を培養し、円管状態への駆動と液漏れのない薬液灌流を確認した。今後、評価実験を重ね、より多くの評価結果を得るために大きく貢献する成果といえる。

研究成果の概要(英文)：This study deals with the tubular artificial gastrointestinal tract (intestinal tract) which can be opened and closed by an integrated micro actuator. The tubular artificial gastrointestinal tract, which was developed by using MEMS technology, can transform from a flat shape for into a tubular structure reversibly during the assay. We can culture and observe cells in the flat state and apply the perfusion in the tubular state. In addition to basic performance of the the tubular artificial gastrointestinal tract micromachine, functional channels were integrated on the substrate in order to improve the efficiency of the operation. In addition, the sealing during the perfusion and controllability of the perfusion condition were improved. Cell culture on the artificial gastrointestinal micromachine could perform well as designed. The assay by using developed artificial gastrointestinal micromachine will certainly contribute to obtain more evaluation results in future.

研究分野：MEMS

キーワード：ナノバイオシステム マイクロマシン 薬剤吸収評価

1. 研究開始当初の背景

創薬研究における培養細胞組織の活用は、iPS 細胞研究の躍進もあり、さらに重要性が増している。薬効評価において、薬剤吸収や透過を評価することは重要である。現状では、ディッシュ上やウェルといった平面状の培養細胞(組織)を用いた評価系が主流である。一方、細胞工学研究の発展とともに、より生体に近い三次元的な構造を有する培養細胞組織の導入への期待が高まっている。

2. 研究の目的

本研究では、工学(MEMS)研究者と薬学研究者が連携し、薬効評価のための『開閉能を有した管状人工消化管(腸管)』の実現に取り組んでいる。本研究では消化管での薬剤吸収に着目し、人工消化管の実現を目指している。ディッシュ上やマイクロウェル内での培養細胞組織を用いる手法よりもさらに生体に近い形態実現に取り組んでいる。具体的には、バイオ技術と整合性の高い MEMS 技術を活用し、人工消化管マイクロマシンとして人工腸管の実現を目指す。人工腸管の円管形状の形成、開閉機能の付与、培地や薬剤の灌流機能を設計実現する。MEMS 技術により実現する細胞培養基材構造は、平板形状と円管形状を可逆的に変換可能であり、灌流時と観察時に切り替え可能とする。実現した人工消化管による薬剤効果評価を実施し基盤を整え、将来の幅広い応用展開を目指している。図1に人工消化管マイクロマシンの動作イメージを示す。円管形状に変形するための人工筋肉を内蔵したマイクロマシン上に細胞を播種、静置培養し、細胞層を形成する。円管形状に形態を変化させ、薬液を灌流する。適当な時間経過後、平面状態に形態をもどし、細胞の観察や分析を行う。

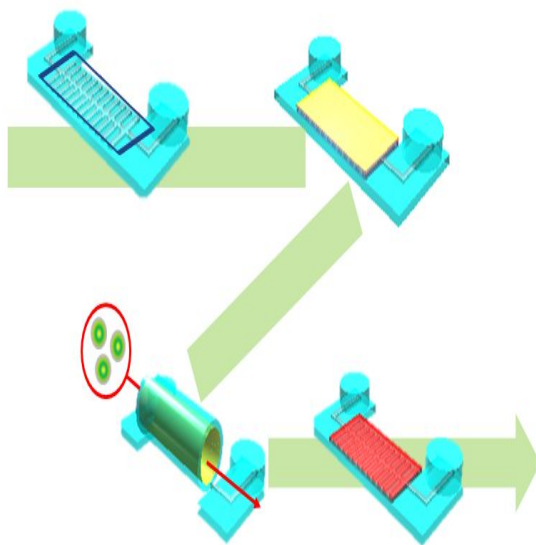


図1 人工消化管マイクロマシン動作図

3. 研究の方法

本研究では、これまで人工消化管マイクロマシンを試作し、円管状態にした人工消化管マイクロマシンに薬液を灌流させ、細胞に取り込まれた薬剤量の評価を試みてきた。実現にあたってはいくつかの課題が顕在化した。特に灌流時の液漏れに関連し、

- ・円管接合面のシール性
- ・円管内の気泡発生
- ・外部チューブとの接続

に関する技術向上が求められた。

シール性の向上に関し、人工生体組織管デバイス円管上部に余分な PDMS 構造を残し、両側の PDMS 余白部を合わせてシールした。灌流時仕様の 10 倍である流量 1 mL/min で灌流実験を行い、人工消化管マイクロマシンの円管上部から液漏れがないことを確認した。

気泡の発生は、人工消化管マイクロマシンの人工筋肉を駆動させる空気が、人工消化管マイクロマシンの構成材料である PDMS を透過したことに起因すると推測された。そこで、PDMS 製の人工消化管マイクロマシンの表面に気体透過性の低いパリレンを成膜し、PDMS の孔を封止した結果、円管内への気泡侵入を抑制することに成功した。

人工消化管マイクロマシン上での細胞培養は、人工消化管マイクロマシン上に培地を溜めて行う。培地により、人工消化管マイクロマシン上の細胞培養面が親水化すると、円管状態にした際の特に入力から薬液が漏れやすくなる。そこで、該当部の表面をマスクで保護することにより、人工消化管マイクロマシンの細胞培養面以外の疎水性を保つことにした。接続部のぬれ性に関する対策により、外部チューブとの接続部、特に円管入口からの液漏れを抑制することができた。

次に、薬液灌流系の構築に取り組んだ。人工消化管マイクロマシンを用いた薬剤吸収実験においては、薬液を 0.1 mL/min、60 分間で灌流するため、液溜め部 6 mL 以上が必要となる。そこで、人工消化管マイクロマシンを土台に設置し、その土台をディッシュに設置した(図2参照)。

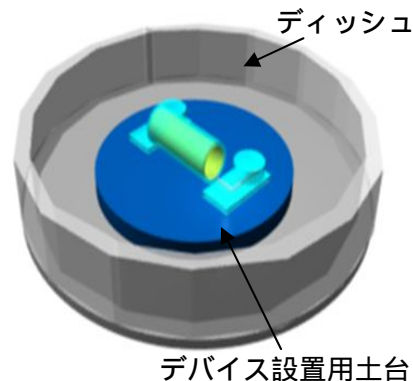


図2 薬液灌流系

これにより、土台の周囲が液溜め部となる。土台の厚さを 5 mm とすることにより、人工消化管マイクロマシンの細胞培養面を顕微鏡の焦点距離内に収めることを可能とし、液溜め部容積 6 mL 以上を得た。これにより、人工消化管マイクロマシンを用いた薬液灌流が可能になった。

4. 研究成果

人工消化管マイクロマシンを用いて Caco-2 細胞への薬剤吸収実験を行った。図 3 に使用した人工消化管マイクロマシンの写真を示す。人工消化管マイクロマシン上へ Caco-2 細胞播種し、1 週間培養を行った後、人工消化管マイクロマシンを円管へ変形させ、薬液を灌流した。このとき、モデル薬剤として蛍光色素であるカルセイン（親水性薬剤モデル）とテキサスレッド（疎水性薬剤モデル）を用いた。薬液灌流後、細胞を観察した。観察の結果、薬液灌流後においても、細胞が人工消化管マイクロマシン上に存在していた。また、蛍光画像により Caco-2 細胞へのカルセインとテキサスレッドの両方の吸収を確認した。一方、溶液の流れが無い静置条件下では、Caco-2 細胞へのテキサスレッドの吸収は確認できなかった。これらの相違は、管壁に Caco-2 細胞を定着させ、管内に液を流した効果であると考えられる。よって、人工消化管マイクロマシンは薬剤の生体外吸収を評価可能であるといえる。

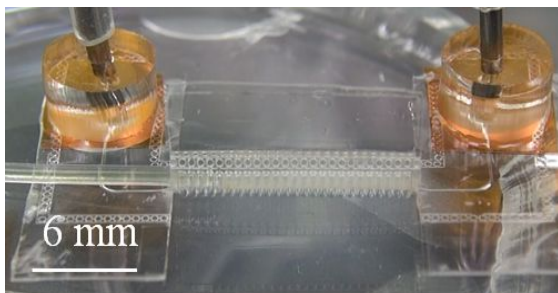


図 3 実現した人工消化管マイクロマシン

さらに、本研究では、生体管内の様々な流体環境を再現するため、人工消化管マイクロマシンの設計を変更し、3 種類の内径(0.5, 1, 2mm)を持つデバイスを製作した。製作したデバイスを用いて、「円管内径」と「薬液流量」を変更するパラメータとし、細胞への薬剤取り込み評価を行った。

一つ目の実験として、同一の内径をもつ人工生体管デバイスに異なる流量で薬液を送液し、細胞への薬剤の取り込み量を評価した。本実験は、同じ内径の人工消化管マイクロマシンに異なる流量で薬液を灌流し、流量を変更する事で力学条件を変更する。つまり、細胞への薬剤吸収の流量依存性評価を目標とする。使用する人工消化管マイクロマシンは、

駆動時に内径が 1mm、長さが 20mm となるものを使用した。結果、脂溶性の高いクロルプロマジン塩酸塩では、流量が多くなる、つまりせん断応力が高くなるほど吸収量が多くなることがわかった。

次に二つ目の実験として、異なる内径のデバイスに同一流量で薬液を灌流させた場合の、細胞への薬剤取り込み量を評価することにした。円管内壁にかかるせん断応力は内径半径 R の 3 乗に反比例することから、図 4 のような関係が求まる。本実験では、内径の異なるデバイス 3 種類(内径 0.5, 1, 2mm 長さ 10mm)を使用した。図 5 に内径 2 mm の人工消化管マイクロマシンの写真を示した。左右のマイクロマシンが駆動し、上部のシーリング部が接着して円管状態を形成している。

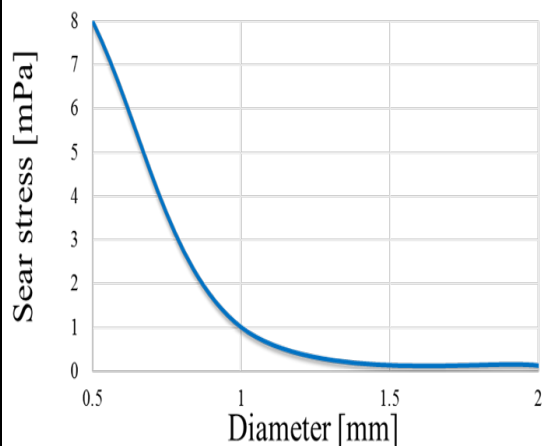


図 4 内径とせん断応力の関係 (同一流量時)

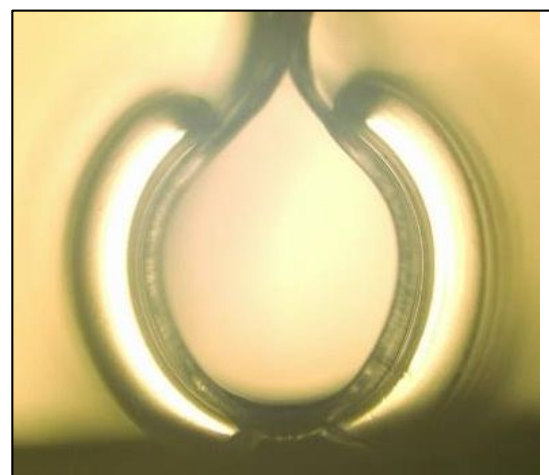


図 5 人工消化管マイクロマシンの円管形状の一例 (内径 2mm)

これらの内径の異なるデバイス 3 種類(内径 0.5, 1, 2mm 長さ 10mm)を使用し、Caco-2 細胞を培養し、各種試薬の灌流実験を実施した。脂溶性の高い Texas Red は、内径が小さい、つまりせん断応力が大きい際には、薬剤がより多く細胞へ取り込まれている結果が

得られた。一方、脂溶性の低いCalceinは内径に依存せず、どのデバイスにおいてもほぼ同一量が吸収される結果となった。図6に直径2mmの人工消化管マイクロマシン上の評価結果を示した。内径0.5mm、1mmの場合も顕著な違いはみられなかった。

これらの結果より、流量依存性評価実験と同様に、脂溶性薬剤のせん断応力依存性が確認できた。この結果より、異なる内径のデバイスに同一流量を灌流させることによって、細胞に負荷する流体条件を変更可能であると確認できた。

本研究では、評価系の信頼性向上に加え、高効率化を進めることにより、人工消化管マイクロマシンを薬剤評価への応用可能性を高めることができた。本研究では、基板中に薬液灌流流路と駆動圧力流路を形成するなど構造の集積化による高効率化を進め、従来10分以上時間を要していたセットアップ作業が3分程度に短縮することができた。今後、評価実験を重ね、より多くの評価結果を得るために大きく貢献する成果といえる。



図 6 Calcein の灌流実験結果
(内径 2mm)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

S. Konishi, T. Fujita, K. Hattori, Y. Kono, Y. Matsushita: “ An openable artificial intestinal tract system for the in vitro evaluation of medicines ”, *Microsystems and Nanoengineering*, 1, 15015, (2015), 査読有,
doi:10.1038/micronano.2015.15.

[学会発表](計 2件)

服部 浩二, 菅間 聡, 小西 聡「開閉可能な人工生体管デバイス上における血管構築」,「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム,長崎県平戸市 平戸文化センター(2016.10.24).

S. Sugama, K. Hattori, and S. Konishi, “Flexible Geometric Design for Openable Biomimetic Tube Providing Variable Flow Conditions for Cell-based Assay” Asia - Pacific Conference of Transducers and Micro - Nano Technology (APCOT), Kanazawa Bunka Hall, Japan (2016.6.27).

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小西 聡 (KONISHI, Satoshi)
立命館大学・理工学部・教授
研究者番号: 50288627

(2)研究分担者

藤田 卓也 (FUJITA, Takuya)
立命館大学・薬学部・教授
研究者番号: 00247785

服部 浩二 (HATTORI, Koji)
立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・准教授
研究者番号: 60409670

河野 裕允 (KONO, Yusuke)
立命館大学・薬学部・助教
研究者番号: 60732823