

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710120

研究課題名（和文）“オンチップ人体”を目指す複数臓器細胞集積型マイクロシステムの創成

研究課題名（英文）Integrated “Body on a Chip” system for cell-based assay

研究代表者

木村 啓志（KIMURA HIROSHI）

東京大学・生産技術研究所・特任助教

研究者番号：40533625

研究成果の概要（和文）：

本研究では、医薬品開発段階における動物実験削減を目指して、「BODY ON-A-CHIP」をコンセプトにヒトの主要な臓器由来の細胞をマイクロ流体デバイスに集積化し、化学物質などの入力に対して臓器間作用を考慮した出力の分析が可能なプラットフォームを構築した。薬物動態において特に重要な小腸・肝臓・肺由来の3種類の細胞をデバイス内に集積化し、実際に生体内で起こりうる抗がん剤作用のメカニズムの再現を実現した。

研究成果の概要（英文）：

In this project, we proposed and developed an on-chip absorption and metabolism model as an alternative method of animal tests. We performed anti-cancer drug tests with cocultured small intestine, liver and lung model cells in the device and showed a possibility of evaluation of pharmacokinetics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：マイクロ流体デバイス、バイオMEMS

1. 研究開始当初の背景

本研究のモチベーションは、医薬品・食品添加物の開発や環境毒性試験における人体影響の評価を効率的に行うために、煩雑な動物実験ではなく簡便な *in vitro* モデルによって体内動態（吸収・分布・代謝・排泄プロセス）を予測することである。以前から細胞を用いた分析実験は行われているが、従来の実験系では単一細胞集団について一種類の細胞応答のみしか測定できず、薬物動力学シミュ

レータによる個体レベルからのボトムアップ的なアプローチでは圧倒的な情報量不足が問題となってしまう。また、従来の培養系では複数種類の細胞を同時に保持することが困難であるため、長時間を要する相互作用や逐次的・複合的な化学物質の暴露シナリオの評価が不可能である。一方、マイクロ流体デバイス技術は送液系や計測系の集積化や並列化が可能であり、さらに毛細血管同様の流体ネットワークにより生体内に近い環

境を模擬することが可能である。申請者はこのような点に着目し、複数臓器由来細胞の安定した共培養とその相互作用を観測可能な新奇のマイクロシステムを提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究は、医薬品開発段階における動物実験削減を目指し、「BODY ON-A-CHIP」をコンセプトにヒトの主要な臓器の細胞をマイクロ流体デバイス内に集積化し、化学物質などの入力に対して臓器間相互作用を考慮した出力の分析が可能なプラットフォームの実現を目標としている(図 1)。マイクロ流体デバイスは微細加工技術を応用して微小な空間に送液系(ポンプ、バルブ)や計測系(センサ)の集積化や並列化が可能のため、次世代の細胞機能解析ツールとして大きく期待できる。本申請課題では、薬物動態において重要な吸収・分布・代謝・排泄の各機能を担う臓器由来細胞を単一のデバイスに集積化し、ヒトの化学物質応答を *in vitro* で予測可能な複数臓器細胞集積型マイクロシステムの開発を目指す。

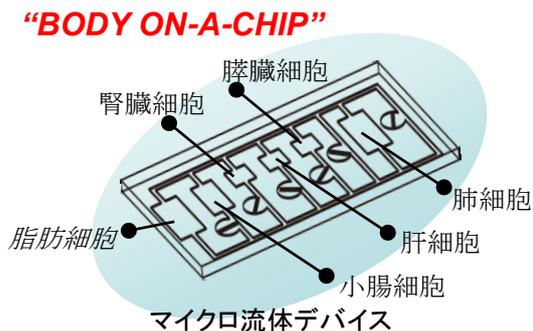


図 1. 本研究のコンセプト

3. 研究の方法

本研究で提案するデバイスは薬物が生体に投与されてから効能を発揮するまでの生体内での薬物動態を再現する必要がある。図 2 (a) に薬物の生体内での挙動を示す。経口摂取された薬物は小腸で吸収され体内に取り込まれる。吸収された薬物は門脈を介して肝臓に輸送され、肝臓での各種化学反応によって代謝され活性化・解毒される。代謝された後、大静脈を介して心臓に輸送され、血流により体全体に送られ循環する。ここで、吸収・代謝において重要な役割を担う生体内環境パラメータとして、小腸と肝臓の表面積・体積比や門脈および肝動脈から肝臓へ流れる血液の流量比などが考えられ、それぞれ約 2:1 および約 3:1 であることが知られている。この構成をデバイスで実現するための概念図を図 2 (b) に示す。多孔膜上に小腸モデル細胞を培養することにより小腸の吸収機能

を再現し、肝臓モデル細胞を培養することにより代謝機能を再現することが可能となる。概念図をもとに設計したデバイスデザインを図 3 に示す。本デバイスは多孔膜に仕切られた上下 2 枚の PDMS チップと 2 つのスターラバーにより構成されている。上層流路には小腸モデル細胞を培養するための小腸チャンバを設けており、小腸膜モデルの再現をする。下層流路には肝臓モデル細胞を培養するための肝臓チャンバを設けており、代謝機能の再現を行う。また、下層流路にはドラッグアッセイのターゲットとなるその他の臓器モデル細胞を培養するためのターゲット細胞チャンバを設けた。上下層には灌流培養を行うために、スターラバーの回転動作を利用したマイクロポンプを内蔵した。スターラバーはデバイス下部に取り付けるスターラモータにより回転させ送液を行う。生理的な環境を模擬するために、小腸チャンバと肝臓チャンバの面積比が 2:1 となるようにそのサイズを決定し、また、流量比が 3:1 となるように門脈流路と肝動脈流路を設計した。下層流路に光ファイバを導入するためのファイバ挿入口を設けた。これは各流路内の物質変化を蛍光計測によって細胞動態をオンライン計測するものである。光ファイバの挿入口は、励起光源との接続用と、分光光度計との接続用の 2 つ設けた。流路構造を持つ PDMS チップはソフトリソグラフィで製作した。2 枚の PDMS チップの間に多孔膜と 2 つのスターラバーをセットしボンディングすることによりデバイスは完成する(図 4)。

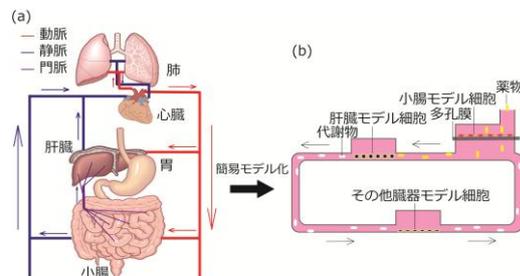


図 2. 薬物動態の概念図

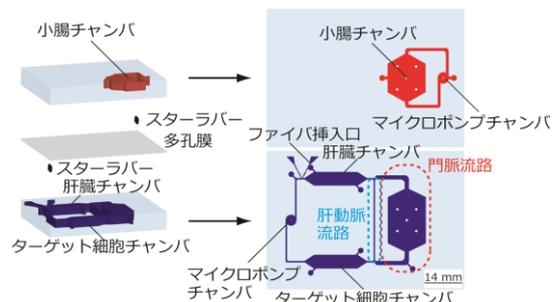


図 3. デバイスデザイン

4. 研究成果

(1) 門脈流路・肝動脈流路流量比評価

デバイスが設計仕様を満たす流量比を再現できるかを確認するため、マイクロポンプで送液し、Particle Tracking Velocimetry (PTV) により流速を測定し流量比を算出した。流速を測定するために流路内を 1 μm 径の蛍光粒子の懸濁液で満たし、デバイス内を流れる蛍光粒子を蛍光顕微鏡により観測した。

測定した門脈流路・肝動脈流路流量比を図5に示す。横軸はスターラバーの回転数を示し、縦軸は門脈流路・肝動脈流路の流量比を示す。結果から流量比はスターラバーの全回転領域で設計どおり3付近であることが確認された。

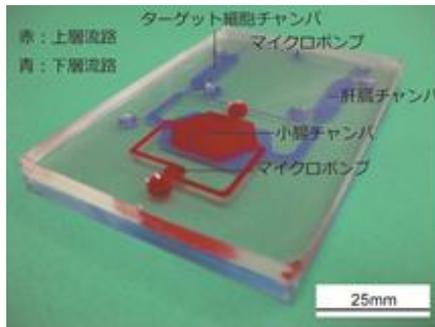


図4. マイクロ流体デバイス

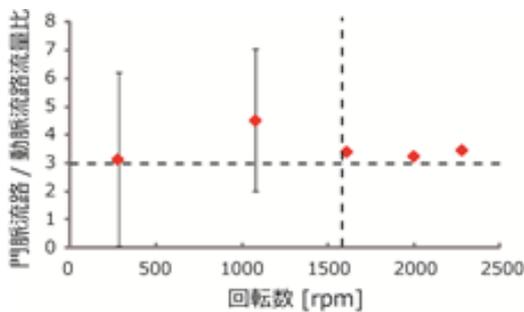


図5. 門脈流路・肝動脈流路流量比測定結果

(2) セン断応力評価

流路内で細胞の状態を保ちながら機能分析を行うためには、本デバイスで送液可能な流速領域で細胞機能に影響を与えないことを確認する必要がある。送液によるせん断応力がおおよそ 0.2~0.6 Pa より大きい場合、細胞機能の低下が生じる。そのため、送液時の最大流速をせん断応力が 0.2 Pa より十分に小さくなるように設定する必要がある。

1600 rpm の時の最大流速を 180 $\mu\text{m}/\text{s}$ 、流路高さを 500 μm 、水の動粘度を $0.89 \times \text{Pa} \cdot \text{s}$ とすると、せん断応力は 1.3×10^{-3} Pa と求められ、0.2 Pa よりも2桁小さいことが確認できた。本検討結果からスターラ回転数が 1600 rpm の時、細胞機能に影響を与えることなく送液できることが確認された。以上

により、実験では回転数を 1600 rpm として送液することとした。

(3) 吸収代謝機能評価

デバイス内の多孔膜上で小腸モデル細胞を、肝臓チャンバで肝臓モデル細胞をそれぞれ培養することにより吸収・代謝両機能を再現可能であることを確認するために、抗がん剤エピルビシン(EPI)と抗がん剤シクロホスファミド(CPA)曝露試験を行った。EPIは静脈投与で用いられる薬剤であり、小腸において吸収されにくい特徴を持つ。CPAはバイオアベイラビリティが74%以上であり、肝臓のCYP2B6により代謝され、代謝活性物4-ヒドロキシシクロホスファミドが強い抗がん作用を示す。

EPI曝露実験では、小腸チャンバに小腸モデル細胞Caco-2(ヒト結腸がん由来細胞)を播種し、単層構造を形成させるために48時間培養後、抗がん剤ターゲット細胞HepG2(ヒト肝がん由来細胞)をターゲット細胞チャンバに播種した。細胞播種後にデバイス上層の培地をEPI 10 μM の培地に置換し48時間培養した。

CPA曝露実験ではEPI曝露試験と同様にCaco-2とHepG2を播種した後、抗がん剤ターゲット細胞A549(ヒト肺胞上皮がん由来細胞)をターゲット細胞チャンバに播種した。細胞播種後にデバイス上層の培地をCPA 1 mMの培地に置換し、48時間培養した。曝露試験後に蛍光色素Calcein AMを用いて生細胞を染色し、ターゲット細胞の生存率を評価した。

図6にEPI曝露試験、図7にCPA曝露試験の結果を示す。これらのデータは、Calcein AMによって染色された細胞の蛍光画像から、画像処理ソフトウェアImageJ(NIH)を用いて生存率を算出したものである。

EPI曝露試験においてCaco-2なしの条件はありの条件と比して約35%の生存率減少が生じ、有意差があることが確認できた。この結果は、上層のCaco-2によりEPIの透過がブロックされ、下層流路のターゲット細胞へ与える抗がん作用が減少したことを示す結果であると考えられる。

一方、CPA曝露試験においてCaco-2がない時、HepG2ありの条件はなしの条件と比して約20%の生存率減少が生じた。またCaco-2がある時、HepG2ありの条件はなしの条件と比して約10%の生存率減少が生じた。この現象は上層流路内の多孔膜上のCaco-2がCPAの透過に影響を与えていること、下層のHepG2に代謝されることによりCPAの抗がん作用が増すことを複合的に示している結果であると考えられる。

以上の結果から、本デバイスを用いて吸収機能・代謝機能に関する臓器間作用の評価が可能であることが示された。

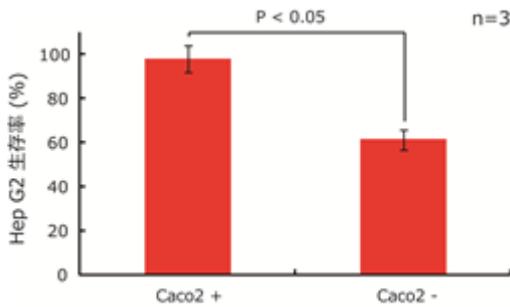


図 6. EPI 曝露試験結果

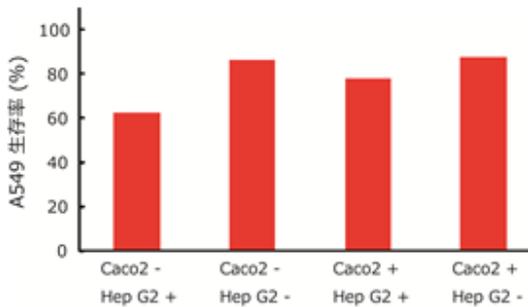


図 7. CPA 曝露試験結果

(4) 光ファイバを用いた代謝機能評価

本デバイスで細胞の代謝機能をオンラインで評価するために光ファイバ検出系を用いて、代謝機能の計測を実施した。本実験では代謝機能指示薬としてレサズリンを用いた。レサズリンは、生細胞により代謝され蛍光産物レゾルフィンを生産する。肝臓チャンバに肝臓モデル細胞 Hep G2 を播種し 12 時間培養後、レサズリンを加えて 6 時間計測した。本検出系ではレゾルフィンの励起光源の波長を 530 nm、蛍光計測波長を 590 nm に設定した。

図 8 にレゾルフィンの蛍光強度計測結果を示す。Hep G2 が生存している場合、時間経過とともに蛍光強度が増加していることが確認でき、Hep G2 が死滅している場合、時間経過による蛍光強度の増加がほぼ確認できなかった。この現象は、Hep G2 細胞が生存している場合、代謝機能によりレゾルフィンが生成されていることを示し、死滅している場合は代謝機能が失われているためレゾルフィンが生成されなかったことを示している。生存している場合、2 時間経過後から蛍光強度の増加がなだらかになっているのは、流路内のレサズリン濃度の減少によるものであると考えられる。以上の結果から、デバイスに集積化した光ファイバ計測系により、蛍光物質および細胞機能のオンライン計測が可能であることを示した。

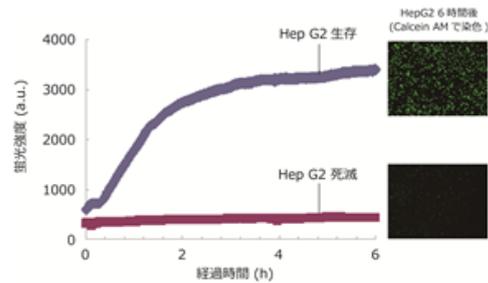


図 8. オンライン代謝活性計測結果

本研究では、薬物動態評価のための吸収代謝モデルの構築およびデバイス評価試験、吸収代謝機能評価試験を行った。オンチップ・オンラインでの薬物動態・細胞機能評価のために光ファイバ検出系を集積化し、蛍光物質を用いた代謝機能の評価を行うことによりオンラインでの計測が可能であることを示した。本研究課題で構築したデバイスは薬物動態評価の新奇のプラットフォームとして、薬物動態評価への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Y. Nakao, H. Kimura, Y. Sakai, T. Fujii, Bile canaliculi formation by aligning rat primary hepatocyte in a microfluidic device, *Biomicrofluidics*, 査読有, Vol.5, 2011, 022212, <http://dx.doi.org/10.1063/1.3580753>
- ② 中尾洋祐, 川田治良, 木村啓志, 酒井康行, 藤井輝夫, 肝細胞培養のための生体内環境を模倣したマイクロ流体デバイス, *化学とマイクロ・ナノシステム研究会誌*, 査読無, Vol.9, No.2, 2010, pp.25-26, <http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/kitamori/CHEMINAS/>

[学会発表] (計 9 件)

- ① 木村啓志, 藤井輝夫, “マイクロ流体デバイスを応用した微小環境操作”, 定量生物学の会第四回年会, 2012 年 1 月 7-8 日, 名古屋大学東山キャンパス
- ② H. Kimura, T. Fujii, “Microfluidic Spatial Control for Cell-based Assay”, *Nagasaki Symposium on Malaria Biology 2011*, 2011 年 11 月 17 日, Nagasaki Univ, Nagasaki, Japan
- ③ 木村啓志, 藤井輝夫, マイクロ流体デバイスを応用した細胞培養環境操作, 第 31 回キャピラリー電気泳動シンポジウム (SCE2011), 2011 年 11 月 10 日, 慶應大学鶴岡メタボロームキャンパス
- ④ 木村啓志, 藤井輝夫, マイクロ流体技術によるバイオ操作～医療応用～に向けて

～、次世代医療システム産業化フォーラム、2011年10月19日、シティプラザ大阪

- ⑤ H. Kimura, H. Takeyama, K. Komori, Y. Sakai, T. Fujii, Microfluidic device with Integrated Electrochemical Sensor for Cell-based Assay in Toxicology, International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM), 2010年5月29日、Kowloon, Hong Kong

[図書] (計1件)

- ① 木村啓志、山本貴富喜、竹内昌治、酒井康行、藤井輝夫、第5章：バイオチップの将来技術、第9節：機能集積型マイクロ流体デバイスの細胞培養への応用、バイオチップ実用化ハンドブック、エヌティーエス出版、pp. 557-563、2010年、書籍分担執筆

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.microfluidics.iis.u-tokyo.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 啓志 (KIMURA HIROSHI)
東京大学・生産技術研究所・特任助教
研究者番号：40533625

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

藤井 輝夫 (FUJII TERUO)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号：30251474
酒井 康行 (SAKAI YASUYUKI)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号：00235128
中尾 洋祐 (NAKAO YOSUKE)
東京大学・工学系研究科・修士課程
池田 崇 (IKEDA TAKASHI)
東京大学・工学系研究科・修士課程