

## 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 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22550083

研究課題名（和文） 抗ガン剤スクリーニングのための水晶振動子センサーによる細胞活性評価技術の開発

研究課題名（英文） Evaluation of cultured cell-activity by quartz crystal sensors for screening of anti-cancer reagents

研究代表者

村松 宏（MURAMATSU HIROSHI）

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：20373045

研究成果の概要（和文）：

水晶振動子センサー上で細胞培養を行い、抗がん剤のスクリーニング技術に応用するため、装置の製作と測定条件の検討を行った。装置の製作では、CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 8 チャンネルの水晶振動子センサーと小型カメラを組み合わせたシステムを完成させた。条件検討では、センサー上の細胞接着表面処理法を決定し、評価のための細胞濃度、細胞培養開始後の抗がん剤添加時期、評価の判断基準について明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We have developed a monitoring system of cultured cells using quartz crystal sensors for evaluating anti-cancer reagents and studied conditions for the evaluation. The development system includes 8 channels of quartz crystal sensors and micro cameras for monitoring the cell activity. We have decided the cell concentration applying for the evaluation and culturing time before the anti-cancer reagent injection, and a surface preparation method for cell adhesion.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：抗ガン剤、スクリーニング、水晶振動子センサー、培養細胞、共振周波数、共振抵抗

## 1. 研究開始当初の背景

癌は、三大疾病の中でも特に治療が難しく、その克服のために、種々の抗ガン剤の開発が進められている。抗ガン剤のスクリーニングでは、原則として実験動物が用いられるが、現在では、培養細胞を用いるスクリーニング法の有用性も認められるようになってきている。

培養細胞を用いるスクリーニング法では、細胞の増殖能力の消失や染色法による細胞の生死を判断する方法がとられるが、判断を行うまでには、数日間の培養が必要であり、判定操作に時間がかかるなどの課題もある。このようなことから、本研究では、水晶振動子センサーを用いることで、培養細胞の状態

をリアルタイムでモニタリングすることによって、細胞の活性変化を調べ、迅速、簡便に抗ガン剤のスクリーニングが行えるシステムの開発を行う。

水晶振動子センサーは、1959年に重量変化の測定が可能であることが示されたことをきっかけに、ガスセンサーとしての応用が始まり、さらに、1982年に溶液中での応用も報告されるようになった。ここで、水晶振動子の共振周波数が液体の粘性によって影響を受けることが指摘され、1985年に共振周波数変化と粘性との関係式が明らかにされた。我々は、1988年に水晶振動子の共振抵抗と表面の液体の粘性との間の関係式を明らかにし、これと並行して、1987年に水晶振動子にプロテインAを固定化したセンサーによって、IgGのサブクラス分析が可能であることを示すなど、バイオセンサーとしての応用研究も進め、この水晶振動子による粘弾性変化測定が、生化学分析、高分子被覆電極の電気化学計測、相転移測定などに利用できることを明らかにしてきた。さらに、共振抵抗の測定手法についても研究を進めるとともに、共振周波数(F)と共振抵抗(R)を2次元プロットしたF-Rダイアグラムを考案し、重量変化と粘弾性変化の解析が行えることを示した。この研究成果を元に1992年にSeiko EG&G社より、世界で初めて水晶振動子の共振周波数と共振抵抗を同時に測定できる計測機器の製品化に成功している。

一方、水晶振動子センサーによる培養細胞のモニタリングの研究も行われている。特に、培養細胞が、基板上に接着する過程についての研究が行われ、共振周波数変化の測定だけでは、十分な判断ができないことが示唆され、細胞接着による重量変化に対して、細胞の粘弾性変化の評価の必要性が示唆されている。また、細胞の培養密度などの条件が測定の再現性において重要であることも指摘されており、並行して細胞の観察を行うことも重要である。こうした点をふまえ、我々は、水晶振動子センサーの電極にITO透明電極を用いることで、水晶振動子センサーの共振周波数、共振抵抗測定と並行して細胞の形態観察を可能とするシステムを構築した。このシステムを用いて、種々の薬物に対する細胞の変化をモニタリングし、F-Rダイアグラムを用いることによって、細胞の変化の傾向を分析できることを示した。また、同時に、細胞内のアクチンフィラメントの観察によって、細胞骨格が、細胞の粘弾性に関与していることも確認している。これらのことから、培養細胞の変化をモニタし検知することが可能であり、これによって、培養細胞に対する抗ガン剤の作用を評価可能であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、水晶振動子センサーを用いて、培養細胞の状態をリアルタイムでモニタリングすることによって、細胞の活性変化を調べ、迅速、簡便に抗ガン剤のスクリーニングを行うための基盤技術の開発を行う。このため、ITO透明電極を形成した水晶振動子センサー上で、細胞培養を行い、共振周波数、共振抵抗測定と並行して細胞の形態観察を行うシステムを構築し、共振周波数と共振抵抗の測定結果から、細胞の状態変化の傾向を分析する。迅速、確実なスクリーニング技術を確立するため、評価条件、判定基準、再現性向上技術について、明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

複数の水晶振動子センサーを同時に扱える多チャンネル型の装置を構築するため、最大8組の水晶振動子センサーの測定を可能とするマルチプレクサユニットを導入し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内において、水晶振動子上で細胞を培養するためのセルを製作し、顕微鏡観察用の小型カメラを組み込んだ。一方、水晶振動子は、水晶板にスパッタリング装置によってITO電極を形成し、熱処理を行った後、使用した。

製作した実験装置を用いて、HepG2細胞、HeLa細胞を用いて、水晶振動子センサー上で、細胞培養を行い、抗ガン剤のシスプラチン、5-FU(フルオロウラシル)を用いてセンサーの応答を調べ、評価条件の検討を行った。

センサー上の細胞接着処理法の最適化のため、従来のコラーゲンコートに対して、アミノシラン処理、グリシン修飾、オリゴペプチド修飾について、検討した。表面修飾における細胞接着力の評価を行うため、細胞を培養したプレートを緩衝液中で回転させる装置を製作し、回転部分の中心からの距離によって液体の流速が異なることを利用して細胞の接着強度を評価した。この接着強度と同時に、細胞接着における水晶振動子センサーの共振周波数の変化量の大きさから評価を行った。

## 4. 研究成果

実験システムの構築では、測定の安定性を向上させるため、測定セルの改良を行い、顕微鏡観察を同時に行うためのビデオ信号と照明電源の切り換え回路を製作し、PCから自動的に動作させるためのプログラムを作成し、顕微鏡用の照明も同期させることで、自動的に連続測定が行えるようになった。さらに、新規に対物レンズを設計し、最適な倍率で細胞観察が行えるようにし、焦点調整機構を容易に微調整できるように改良し、ほぼ完成形が構築できた。実験装置の概略図を図1

に示す。

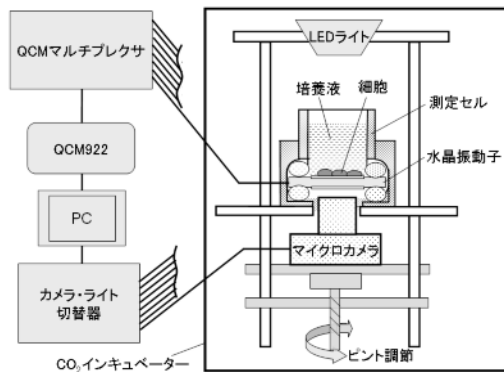


図1 実験装置の概略図

測定例として、HeLa細胞を20時間培養し、シスプラチン(0.1 mM)を加えた時の共振周波数と共振抵抗の測定結果を図2に示す。共振周波数は、細胞播種時に一時的に低下(質量負荷増加)した後、細胞接着過程で、やや上昇し、続いて、細胞の成長によって、徐々に低下する傾向が見られる。抗がん剤を加えることによって、共振周波数の減少が止まり、上昇に転じており、共振抵抗の変化も逆転していることがわかる。図3は、抗がん剤添加時と、9時間後の画像を示したものである。9時間後においては、細胞の脱離や収縮が起きていることがわかる。このように、抗がん剤添加後の共振周波数の増加は、細胞の脱離による重量変化を反映していることが示唆された。より低濃度の抗がん剤の添加では、共振周波数の増加までには至らず、減少が停止するのにとどまるという実験結果が得られている。

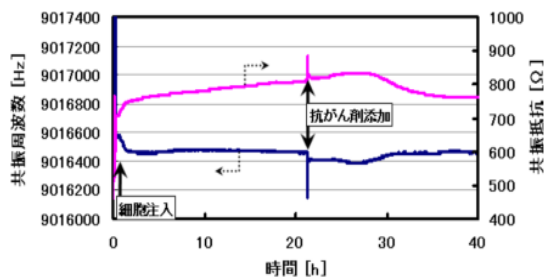


図2 細胞培養と抗がん剤添加における共振周波数と共振抵抗の測定例

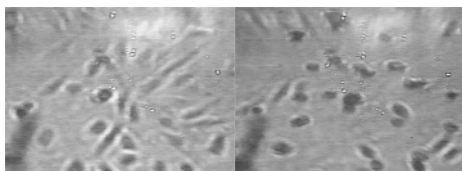


図3 抗がん剤添加時(左)と9時間後(右)のHeLa細胞の観察結果

さらに、共振周波数変化と細胞の変化との対応関係を検討するため、経時的に、生死細

胞数の計測、細胞骨格変化の観察を別途行った。これらの変化の様子を比較した結果、生死細胞数の変化と共振周波数変化が対応していることが示された。

また、細胞種の違いについて検討するため、HepG2細胞とHeLa細胞を用いて実験を行ったが、細胞培養時には、細胞種の違いによる大きな違いは見られなかった。抗がん剤添加後では、変化の違いが見られ、抗がん剤の影響の違いによるものと判断した。

水晶振動子センサー上の表面処理が、応答性や再現性に影響すると考えられることから、従来のコラーゲンコートに対して、アミノ基、カルボキシル基で表面を修飾したセンサーや、低温でコラーゲンモノマーを修飾したセンサーで実験を行い、細胞が接着することを確認するとともに、水晶振動子を用いた実験によって、コラーゲンコートに比べて、化学修飾処理の方が、より大きな応答が得られることが確認できた。さらに、細胞接着強度の検討結果では、コラーゲンモノマー修飾法において良好な結果が得られた。

評価のための培養条件としては、細胞構築後20時間程度経過して細胞が安定化した時点での抗がん剤添加が最適であると判断した。また、細胞濃度については、濃度が高すぎると水晶振動子センサーの応答が細胞濃度に比して、大きく変化しないことが確認され、HepG2細胞では、60 cells/mm程度が良好であると判断した。判定基準については、高濃度の抗がん剤添加では、急激な細胞死による共振周波数の増加がみられ、低濃度の抗がん剤添加においては、図2に示したように、細胞増殖の抑制による共振周波数減少から増加への変化や、減少の停止が見られることから、増殖能の抑制が判定基準になると判断した。

以上のように、多チャンネル型的水晶振動子センサーをCO<sub>2</sub>インキュベーター内に構築し、センサー上で細胞を培養することで、抗がん剤の評価を行える可能性と評価条件を明らかにした。今後、さらに、データを蓄積していくことで、実用的な技術へと応用可能になっていくものと考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

Hyen-Wook Kang, Dong-Yun Lee, Hiroshi Muramatsu, Young-Soo Kwon Influence of Diquat on Growth and Death of HepG2 Cells using Quartz Crystal and Micro CCD Camera, Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 査読有 11(5) 2011 4236-4239

掲載論文の DOI 10.1166/jnn.2011.3660

〔学会発表〕(計7件)

大谷直人, 村松宏, 水晶振動子センサーによる培養細胞活性評価及び細胞接着表面の最適化, 日本化学会第93春季年会, 2013.03.24, 立命館大学・びわこ・くさつキャンパス(滋賀県)

村松宏, 水晶振動子センサーによる測定技術と培養細胞の状態評価への応用, BioJapan 2012, 2012.10.12, パシフィコ横浜(神奈川県)

村松宏, 水晶振動子センサーによる培養細胞の活性評価とその抗ガン剤評価への展開, BIOtech2012, 第11回国際バイオテクノロジー展, 2012.04.26, 東京ビッグサイト(東京都)

加瀬大幹, 姜顯旭, 村松宏, 水晶振動子センサーによる培養細胞評価のための細胞接着表面の最適化, 第72回応用物理学会学術講演会 2011.08.31 山形大学(山形県)

Hyen-Wook Kang, Hiroshi Muramatsu, Burm-Jong Lee, Young-Soo Kwon, Monitoring for cytoskeletal change in cultured cells under chemical stressor using QCM, 2010 International Conference on Nano Science and Nano Technology, 2010.11.08, Gwangju Institute of Science and Technology, Gwangju, Korea

加瀬大幹, 姜顯旭, 村松宏, 水晶振動子センサーによる培養細胞測定のための細胞接着マトリクスの最適化, 第71回応用物理学会学術講演会 2010.9.16 長崎大学(長崎県)

Hyen-Wook Kang, Burm-Jong Lee, Young-Soo Kwon, Hiroshi Muramatsu, Monitoring for intra cellular cytoskeletal change by chemical stressors using quartz crystal microbalance, The 3rd International Nano Bio Conference 2010, 2010.08.24, Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Swiss

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

村松 宏 (MURAMATSU HIROSHI)  
東京工科大学・応用生物学部・教授  
研究者番号: 20373045

### (3)連携研究者

姜 顯旭 (KANG HYEN-WOOK)  
東京工科大学・片柳研究所・研究員  
研究者番号: 40572392  
(H24:研究協力者)

### (4)研究協力者

山本 裕二  
セイコー・イージーアンドジー株式会社・  
営業部・主任