

## 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 5 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650099

研究課題名（和文） 人工消化管粘膜の構築

研究課題名（英文） Development of an artificial intestinal mucosa

研究代表者 福島 浩平 (FUKUSHIMA KOUHEI)

東北大学・大学院医工学研究科・教授

研究者番号：20271900

## 研究成果の概要（和文）：

立体的微小構造体の作製に適した精密微細加工技術 (Micro Electro Mechanical Systems, MEMS) を用いて消化管の粘膜構造を作成し、培養細胞との組み合わせにより絨毛・陰窩様構造を有するいわば「人工消化管粘膜」の作成を試みた。MEMS 技術により、微小突起を多数有する「小腸様」表面構造物、微小陥凹を有する「大腸様」構造物を作製した。その上に人工の膜をはり、細胞を培養することができた。物質のやり取りが可能なシステムを作り上げることにより、人工の粘膜を作りうる可能性が示された。

## 研究成果の概要（英文）：

We tried to construct “artificial intestinal mucosa”, which is composed of villus- and crypt-like structures, using micro electric mechanical systems (MEMS), which are utilized for creating 3-dimensional micro-constructs. We successfully made “small intestine“-like structures featured by multiple projections on the surface and “colon“-like structures with multiple hollows. We covered the irregular surface with the artificial membrane on the structures and cultured epithelial cells. We might generate an artificial mucosa by inventing a new system enabling exchange of molecules between epithelial cells and cells under basal membrane.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	0	1,600,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	390,000	3,290,000

研究分野：外科系臨床医学・消化器外科学

科研費の分科・細目：人間工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：消化管、粘膜、人工臓器

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 消化管粘膜では、多細胞種からなる三次元的空間において、互いに液性因子や細胞接着を通じて情報交換し恒常性を維持している。実際の疾患では炎症・腫瘍にかかわらずネットワーク環境下で発生するが、現状の in vitro の実験系は、多種細胞からなる三次元

的微小環境を再現しているとは言い難い。

(2) 例として大腸癌に対する薬剤の抗腫瘍効果について考える。従来の培養系では、腸内細菌はおろかりンパ球、マクロファージ、平滑筋細胞、線維芽細胞、神経細胞もない。現実には重要であるはずの多種細胞間の情報伝達は全く配慮されない。

(3) in vivo のシステムに組み入れようとする、ヌードマウスの”皮下“に定着させるようなことが行われており、そこでは消化管の微小環境はまたも考慮されることはない。消化管粘膜を模した多種細胞系からなる三次元的構造物（ここでは人工粘膜と呼ぶ）の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

物質透過性を有する人工消化管基底膜を作成し、絨毛・陰窩様構造上で上皮細胞を培養する。さらに、単層の平滑筋培養と上皮様構造の間にリンパ球・マクロファージを含む「人工粘膜固有層」を作成し、人工粘膜の基本構造を完成する。

## 3. 研究の方法

人工消化管上皮基底膜の作製と細胞培養実験に大別される。

### (1) 基底膜作成

- ① フォトレジストをスピコートによりシリコンウェハー上に塗布し、プリベーク（加熱）によりレジストを固定。
- ② 投影露光により適切な波長の光を照射し、レジストと反応させる。
- ③ 露光したウェハーを現像液に浸し余分な部位のレジストを除去する。リンス液で数回すすぎ不要部分を完全に除去、ポストベーク（加熱）によりリンス液を除去。
- ④ エッチングにより不要部分を除去し陥凹パターンを成形する（レジストの残っている部位はエッチングにより除去されない）。最後に溶剤によりレジストを完全に除去する。
- ⑤ ナノポリイミド粒子（大阪府立産業技術総合研究所より提供）を電着塗装により、凹凸のシリコン板上に粒子薄層を形成し微小孔を作製する。
- ⑥ Parylene を真空蒸着によって、シリコンウェハー上に成膜する。シリコンウェハー反対側にフォトレジストを塗布し、一連の処理によりシリコン不要部分を除去する。

### (2) 細胞培養実験

- ① 凹凸立体構造上で上皮細胞株を培養し細胞回転や分化マーカーの検討を行う。
- ② 粘膜固有層の支持体として各種ハイドロゲルを検討するとともに、ゲル内での単層系細胞の培養を検討する。
- ③ 細胞含有粘膜固有層ハイドロゲルを平滑筋単層培養と上皮層との間に挿入し三次元構築を達成する

## 4. 研究成果

(1) 粘膜上皮の「足場」となる「パリレン基底膜」作製工程の確立

2cm 角のシリコンウェハーに4～6個の複数の領域をもうけて、絨毛様構造を有するParylene 基底膜を作製した。フォトレジストをスピコートによりシリコンウェハー上に塗布し、プリベーク（加熱）によりレジストを固定した。次いで、投影露光により適切な波長の光を照射し、レジストと反応させた（感光した部分が残る、いわゆるネガレジストを使用した）。露光したウェハーを現像液に浸し余分な部位のレジストを除去し、さらに、リンス液で数回すすぎ不要部分を完全に除去、ポストベーク（加熱）によりリンス液を除去した。エッチングにより不要部分を除去し陥凹パターンを成形し（レジストの残っている部位はエッチングにより除去されない）、最後に溶剤によりレジストを完全に除去した。Parylene を真空蒸着によって、シリコンウェハー上に成膜した。

基底膜様構造物である Parylene に物質交換のための小孔をあける工夫であるが、微粒子の電着による凹凸面の形成を試みたが、均一に付着する条件を見いだせなかった。

### (2) 凹型構造物の作製

凸型構造物に続いて、大腸の陰窩様構造を模して凹型のシリコンウェハーを作成し、Paryleneを真空蒸着によって生膜した。基底膜様構造物であるParyleneに物質交換のための小孔をあける工夫であるが、微粒子の電着による凹凸面の形成を試みたが、凸型構造物と同様に均一に付着する条件を見いだせなかったため、代替手段として高エネルギー粒子線ビームによる多効果を検討した。しかし、角度的に偏りなく多孔化することが難しく、サイクロトロンセンターも被災したため実現できなかった。

### (3) 細胞培養実験

- ① Parylene 生膜した凸型微小構造物の上で、小腸上皮細胞株 IEC-6 を培養し、実体顕微鏡下で観察を行った。小腸絨毛様構造の基底側には、細胞が道に増殖していたが、絨毛側面（必ずしも十分な観察はできなかった）および絨毛様構造頂部では、細胞の分布は不均一であった。このことから、均等な細胞接着と増殖にはフィブロネクチンなどの基底膜タンパクの塗布が必要であることが予想された。また、凹型構造物上では小腸上皮細胞株 IEC-6 を培養すると陰窩底面および表面には細胞が密に増殖したが、陥凹部側面の観察は十分でなかった。
- ② そこで、発想を変換し凹凸様構造に Poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) マイクロ (ナノ) 粒子を付着させます平滑筋細胞

を培養し平滑筋の産生する基底膜用物質の上に上皮細胞を生育させることとした。PLGA は生分解性であることから、加水分解されるはずである。PLGA マイクロスフェアは、エマルション溶媒拡散法により作製した。PLGA および有機溶剤からなる有機相と薬剤の水溶液を混和し、乳化することで Water-in-Oil エマルションとし、さらにこれを 1% PVA と混和後乳化して Water-in-Oil-in-Water エマルションとした。このエマルションを一晩攪拌して有機溶剤を蒸発させた後、マイクロスフェア表面に付着した薬剤などを洗浄するために、蒸留水やリン酸緩衝生理食塩水に分散し遠心するという操作を数回行った。作製した粒子径、Z 電位を粒子計 ELSZ-2 (大塚電子) にて測定した。ところが、平滑筋細胞株 CCD-18 の培養中に震災が発生し、培養実験は施行できなかった。

#### 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 15 件)

1. M. Hinata, A. Kohyama, K. Fukushima, et al. A shift from colon- to ileum-predominant bacteria in ileal-pouch feces following total proctocolectomy. *Dig Dis Sci* 2012 (印刷中) (査読有) (11 人中 11 番目)
2. T. Watanabe, K. Fukushima et al. Interval of less than 5 years between the first and second operation is a risk factor for third operation for Crohn's disease. *Inflammatory Bowel Disease* 18: 17-24, 2012 (査読有) (7 人中 4 番目)
3. 福島浩平、小川 仁、佐々木巖ほか 難治性回腸の炎の病態と治療 *胃と腸* 46: 2003-2008, 2011 (査読無) (14 名中 1 番目)
4. 福島浩平、小川 仁、日當愛美、小森佑奈、佐々木佳織、佐々木巖ほか 回腸囊炎の病因・病態と腸内細菌叢 *IBD Research* 4: 89-96, 2010 (査読無) (11 人中 1 番目)
5. A. Kohyama A, K. Fukushima, et al. Bacterial population moves toward a colon-like community in the pouch after total proctocolectomy. *Surgery* 145: 435-447, 2009 (査読有) (9 人中 9 番目)
6. K. Watanabe, K. Fukushima et al. Hand-assisted laparoscopic vs. open subtotal colectomy for severe ulcerative colitis. *Dis Colon Rectum* 52: 640-645, 2009 (査読有) (6 人中 3 番目)
7. 福島浩平、小川 仁、佐々木巖ほか 回腸囊炎の診断と臨床経過-初期病変の診断を目指して *胃と腸* 44: 1568-1573, 2009 (査

読無) (11 人中 1 番目)

8. H. Shiga, S. Takagi, K. Fukushima et al. What determines the later clinical course of patients who do not undergo colectomy at the first attack? A Japanese cohort study on ulcerative colitis. *Digestion* 81: 104-112, 2009 (査読有) (12 人中 10 番目)
9. K. Takahashi, Y. Funayama, K. Fukushima, et al. Ileal J-pouch perforation at the blind end: report of a case. *Surg Today* 39: 780-786, 2009 (査読有) (6 人中 3 番目)
10. M. Nagao, C. Shibata, Y. Funayama, K. Fukushima, et al. The effect of a total colectomy on the motor inhibition of the upper gut induced by intra-ileal stimuli in conscious dogs. *Surg Today* 39: 780-786, 2009 (査読有) (10 人中 4 番目)

[学会発表] (計 6 件)

1. 平嶋 均、福島浩平ほか 消化器系ストーマ感染起因菌の分子生物学的解析 第 29 回ストーマリハビリテーション学会 2012 年 2 月 4 日 郡山
2. 福島浩平ほか 大腸全摘術後回腸囊の腸内細菌叢の変動 第 66 回日本大腸肛門病学会 2011 年 11 月 25 日 東京
3. 日當愛美、福島浩平ほか 潰瘍性大腸炎に対する大腸全摘術後の腸内細菌叢の変動 第 15 回腸内細菌学会 2011 年 6 月 16 日 東京
4. 小森佑奈、福島浩平ほか Differential Display による腸内細菌 mRNA 解析の試み 第 15 回腸内細菌学会 2011 年 6 月 16 日 東京
5. 羽根田祥、福島浩平ほか はちみつ摂取による便中腸内細菌叢への影響 第 15 回腸内細菌学会 第 15 回腸内細菌学会 2011 年 6 月 16 日 東京
6. 佐々木佳織、福島浩平ほか 消化管を標的としたドラッグデリバリーシステムの検証と応用 第 87 回 日本消化器病週間 2010 年 10 月 21 日 横浜

[図書] (計 2 件)

1. 福島浩平ほか 南江堂 リハビリスタッフに求められる薬・栄養・運動の知識 小腸機能障害 2010 年 212-220
2. 福島浩平ほか 京都大学出版会 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス 炎症性腸疾患とプロバイオティクス 2010 年 521-526

[その他]

ホームページ等

<http://www.surg1.med.tohoku.ac.jp/class/molecule.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福島 浩平 ( FUKUSHIMA KOUHEI )  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：20271900

### (2) 研究分担者

芳賀 洋一 ( HAGA YOICHI )  
東北大学・大学院医工学研究科・教授  
研究者番号：00282036

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：