

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23615001

研究課題名(和文)細胞層の透過率分布の可視化に基づく新しい有害・有用物質スクリーニング法の研究

研究課題名(英文)Development of novel screening method based on the visualization of permeability distribution of cell layer

研究代表者

宮本 浩一郎(Miyamoto, Koichiro)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70447142

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：化学イメージセンサは、イオンなどの化学種の分布を可視化するセンサである。本研究では、従来よりはるかに小型で安価、かつスタンドアロン動作可能なポータブル化学イメージシステムを構築した。また、従来型の化学イメージセンサも併用しながら、細胞層の電気抵抗分布を可視化することに初めて成功した。これは、細胞間のタイトジャンクションの分布を電気的な特性をもとに可視化することに繋がる極めて重要な成果であり、今後の新規細胞アッセイへの展開が期待できる。さらに、研究の過程で、電極を用いて細胞層の測定する従来のTER測定を同時に4サンプルまで測定できる装置も開発した。

研究成果の概要(英文)：Chemical image sensor is a sensor which can visualize the ion distribution in the electrolyte. In this study, a portable chemical imaging system which is small, inexpensive and working stand-alone was developed. In addition to that, the visualization of resistivity distribution of cultured-cell layer was succeeded. It indicates that the visualization of the tight-junction based on electrical property will be possible in the future. Based on this result, novel screening assay to evaluate the influence of chemicals to the cells can be also expected.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：安全環境計測法

キーワード：化学センサ タイトジャンクション スクリーニング 細胞アッセイ

1. 研究開始当初の背景

pHやイオン濃度を測定する半導体化学センサは、工業・生物学・医療等の多分野で必須であり、国内外で広く研究されてきた。近年では、化学センサの発展として、イオン分布を画像化する「化学イメージング」が大きな関心を集めている(東北大学 吉信ら、豊橋技科大 澤田ら)。過去には、「pH イメージング顕微鏡」((株)堀場製作所)が製品化されているが、具体的なアプリケーションの提案が少ない、装置自体が大型といった問題のため、広く普及するには至っていない。そこで本研究では、「ポータブル化学イメージシステム」によって「細胞層の透過率分布の可視化」に取り組み、「有害・有用化学物質のスクリーニング」を目標とする。

化学物質スクリーニング研究が重要となる背景として、近年、若年者のアレルギー疾患の増加が報告されてきた。そのため、アレルギー・環境ホルモンとして作用しうる種々の候補物質の影響を調べる「有害化学物質のスクリーニング法」の開発が急務となっている。また、他方では、生物多様性条約(2006年)に基づいた生物資源探査が活発化しており、「有用化学物質のスクリーニング」を効率的に行うアッセイ法の必要性も増している。

2. 研究の目的

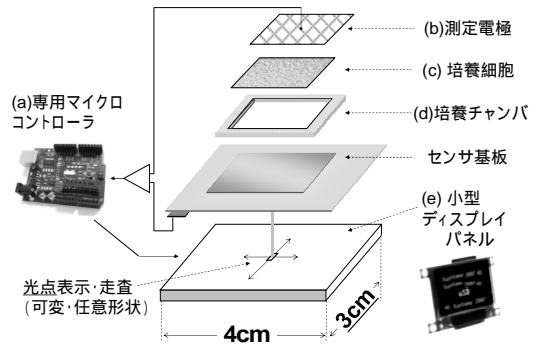
本研究の目的は、「ポータブル化学イメージシステムを用いた細胞層の透過率分布の可視化により、有害・有用化学物質の新規スクリーニング法を提案」することである。ポータブル化学イメージシステムは、手のひらサイズでありながら、注目領域の空間分解能を自在に変更しつつセンサ面上の化学種の分布を化学イメージとして取得可能であり、細胞層の透過率分布の可視化に最適である。細胞層の透過率分布観察によって、細胞間接合の分布変化に基づく新しい細胞計測により、化学物質が生体に及ぼす影響を効率的に評価する方法を検討する。

3. 研究の方法

化学イメージ測定には、走査光源が必要である。研究代表者は、これまでに小型ディスプレイパネル上に表示した光点の使用を提案してきた。ディスプレイパネル上の光点のサイズ変更により、空間分解能を瞬時かつ自在に変更することが可能であり、さらに瞬時に任意の箇所へ光点移動することもできる。また、光点の形状を自由変形することによって測定対象に最適な注目領域を定義することが可能であり、細胞層の透過率分布測定に最適である。なぜならば、細胞層全体の平均的な透過率を測定することもできれば、すぐさま空間分解能を変更して、細胞層で変化が起きている一部のみを詳細に測定することもできるからである。

小型ディスプレイパネルの使用により、光

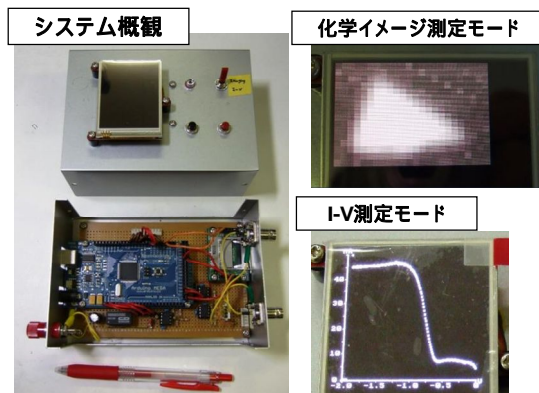
源を含む走査型光学系の小型化が実現される。さらに測定プログラムを搭載する制御コントローラの小型化によって、下図に示す測定システムを1つの筐体にパッケージ化することが可能となり、スタンドアロン動作可能なシステムを構築する。



センサ表面の改質・測定電極・培養チャンバの形状、培養環境を維持しながら測定を行う機構などの技術課題を、これまでの細胞を用いたバイオセンシング研究で培った成果および、研究分担者との協調によって解決し、細胞層の透過率分布の可視化を行う。細胞群のタイトジャンクションの変化によって、細胞層の透過率分布が変化する様を観察できる手法を確立する。

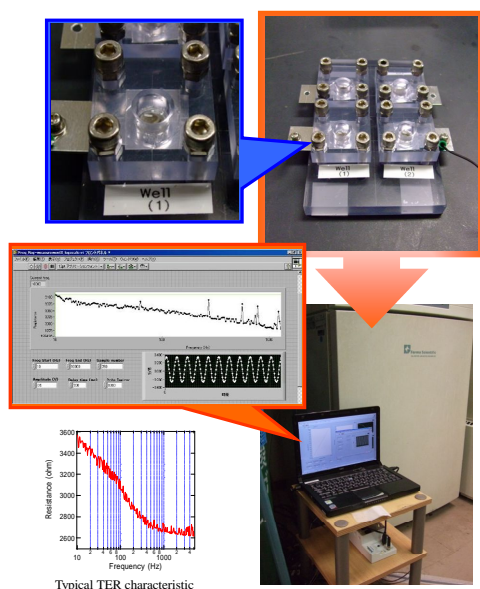
4. 研究成果

平成23年度:スタンドアロン動作可能な、ポータブル化学イメージシステムを構築した(下図)。システム全体の制御にはバッテリー駆動可能なマイクロコントローラを使用した。測定に必要な走査型変調光源には、有機ELディスプレイ上に表示される光点を用いた。マイクロコントローラの制御プログラムには、測定モードとして、センサ基板上的pH二次元分布を取得する「化学イメージ測定モード」と、センサ基板上的1点でpHを精密に測定するために、交流光電流バイアス電圧特性(I-V特性)を取得する「I-V特性測定モード」の2つを実装した。それぞれのモードで取得した測定データは装置上面のディスプレイパネルに表示すると同時に、SDメモリカードに記録されるため、測定終了後にPCなどに読み込んで任意の解析処理を行う利便性も備えている。



さらに測定システムの評価も行った。pH4, 5, ..., 8 の pH 標準液の交流光電流 バイアス電圧特性 (I-V 特性) を取得し、I-V 特性曲線の変曲点電圧のプロットから、pH 感度 51.4mV/pH で pH 変化を検出可能であることを確認した。この値を用いることで pH 未知の溶液を測定することができる。

平成 24 年度：半導体センサを用いた測定の前段階として、メンブレン上に単層培養された腸管上皮細胞の電気特性を、金属電極によって測定するシステムを製作した。従来、細胞層の電気抵抗測定は手動によって1つずつ行われており、経時的な測定は煩雑で熟練を要するものであった。本システムでは、試料と電極を設置した後は、測定ボックスごと細胞培養器内に導入して自動測定を行うことができるため、簡便かつ高時間分解能の測定が可能となった。



さらに、上記システムを改良し、同時に 4 検体を測定できるように拡張した。抵抗値測定のみであれば最大 4 検体、位相遅延・進みまで含めた電気特性では最大 2 検体を各周波数で測定することができる。この系を用いた測定から、通常の化学イメージセンサ測定よりも低い周波数で光源を変調した方が電気特性の差違がはっきりと観測される可能性が示唆された。また、研究代表者の宮本が以前から提案している位相モード測定も適用可能である可能性が示された。さらに、測定ウェルの設計やシールドボックスの構造など化学イメージセンサを用いた測定系の構築に向けて様々なノウハウを蓄積することができた。以上の成果について学会講演（うち 1 件は招待講演）を通じて報告した。

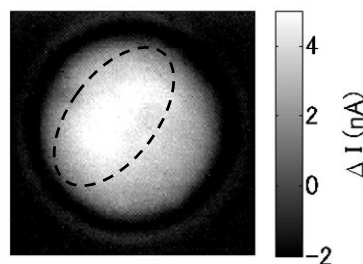
これまでに構成したポータブル化学イメージシステムを用いて細胞層の抵抗率分布を可視化するために、細胞層の周波数特性を調査し、さらに細胞培養器内でリアルタイム観測を行うためのノウハウを蓄積した。申請書の段階では、細胞層をセンサ表面に直接培養することを検討していたが、細胞層に本来

の機能を持たせるためには透過性のメンブレン上に培養することが望ましいようであるため、測定系の設計を変更した。つまり、センサ表面に測定ウェルを設置し、測定時のみセルカルチャーインサートを挿入して測定を行う。この構成は、先行研究で用いられてきた培養表面を用いるため、センサ表面の修飾や培養液中での長期安定性を考慮する必要がなくなる利点もある。

以上の成果に加えて、ハン博士の協力の下に、腸管上皮細胞の培養系を宮本の在籍する東北大学でも確立し、より迅速な研究をすすめる体制を整備した。

平成 25 年度：まず、細胞培養用の透過メンブレン上に樹脂パターンを形成し、従来型の化学イメージシステムで測定を行った。化学イメージより、樹脂パターンの有無が光電流の分布として観測され、これは抵抗率の空間分布が反映されたものであると確認された。また、実験を繰り返すことによって、メンブレン裏面とセンサ面が密着していることが重要であると判明し、適切な状態にメンブレンを設置するための専用治具を設計・製作した。

次に、メンブレン上に腸管細胞の単層培養を行い、実際の腸管壁と同様に対とジャンクションを形成した状態で細胞層の化学イメージを取得した。細胞層にごく一部欠損を形成した場合、化学イメージ中に欠損パターンと同様の形状で明瞭な電流分布を確認した（下図破線領域）。これは、細胞層中の抵抗率分布を反映していると考えられ、世界初の成果であると同時に、化学イメージセンサによる透過率分布の可視化が可能であることを示すものである。なお、研究の主要な成果は日本動物細胞工学会（招待講演）および、応用物理学会（講演奨励賞受賞）にて報告した。



今後は、均一な細胞層に対して薬物刺激を与えた場合についても研究を進め、細胞層内の抵抗率分布の可視化をスクリーニング手法として確立する。

また、本研究は、有機 EL ディスプレイを用いた測定系による微小流路内の化学反応測定や、小型ヘッドタイプの化学イメージセンサ開発による大腸菌コロニー検出など、複数のアプリケーションにも波及しており、これらについても論文や学会発表を通じて報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Junkyu Han, Yui Kurita, Hiroko Isoda, Genistein-induced G2/M cell cycle arrest of human intestinal colon cancer Caco-2 cells is associated with Cyclin B1 and Chk2 down-regulation, *Cytotechnology*, 査読有, 65 巻, 2013 年, 973-978

DOI: 10.1007/s10616-013-9592-0

Tomoko Shiobara, Takeo Usui, Junkyu Han, Hiroko Isoda, Yoko Nagumo, The Reversible Increase in Tight Junction Permeability Induced by Capsaicin is Mediated via Cofilin-Actin Cytoskeletal Dynamics and Decreased Level of Occludin, *PLOS ONE*, 査読有, 8 巻, 2013 年, e79954

DOI: 10.1371/journal.pone.0079954

Ko-ichiro Miyamoto, Yuji Hirayama, Torsten Wagner, Michael J. Schöning, Tatsuo Yoshinobu, Visualization of enzymatic reaction in a microfluidic channel using chemical imaging sensor, *Electrochimica Acta*, 査読有, 113 巻, 2013 年, 768-772

DOI: 10.1016/j.electacta.2013.08.089

Carl Frederik Werner, Torsten Wagner, Ko-ichiro Miyamoto, Tatsuo Yoshinobu and Michael J. Schöning, High speed and high resolution chemical imaging based on a new type of OLED-LAPS set-up, *Sensors and Actuators B: Chemical* 査読有, 175 巻 2012 年, 118-122.

DOI: 10.1016/j.snb.2011.12.102

〔学会発表〕(計 10 件)

佐藤舞子, 宮本浩一郎, 吉信達夫, 小型化学イメージセンサヘッドの開発と大腸菌コロニー検出への応用, 第 56 回化学センサ研究発表会, 2014 年 3 月 29~31 日, 大阪

Carl Frederik Werner, Tatsuo Yoshinobu, Ko-ichiro Miyamoto, Michael J. Schöning, Torsten Wagner, OLED-based and embedded sensor platform for chemical imaging (IMCS 2014), 2014 年 3 月 16~19 日, アルゼンチン, ブエノスアイレス

于冰, 宮本浩一郎, 吉信達夫, 「化学イメージセンサを用いた細胞層の抵抗分布測定に関する検討」, 第 68 回応用物理学会東北支部学術講演会, 2013 年 12 月 5~6 日, 山形

宮本浩一郎, 「小腸培養細胞株を用いた多チャンネル TER 測定とタイトジャンクション可視化への取り組み」(招待講演), 第 26 回日本動物細胞工学会 2013 年度大会, 2013 年 7 月 18~19 日, 福井

宮本浩一郎, 吉信達夫, 「半導体化学イメージセンサ ~ 近年の進展とその応用例 ~」(招待講演), 日本鉄鋼協会 第 165 回春季講演大会 「革新的水素侵入抑制

表面の構築にむけて」シンポジウム, 2013 年 3 月 27~29 日, 東京

K. Miyamoto, J. Han, T. Yoshinobu and H. Isoda, Development of the system for multi-channel TER measurement, The 25th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2012), 2012 年 11 月 27 日, 名古屋

K. Miyamoto, Y. Hirayama, T. Wagner, T. Yoshinobu, and M. J. Schöning, Visualization of enzymatic reaction in a microfluidic channel using chemical imaging sensor, 9th International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technology (EMNT 2012), 2012 年 9 月 15~17 日, オーストリア, リンツ

Y. Hirayama, K. Miyamoto, T. Wagner and T. Yoshinobu, Position Control of Chemical Reaction in a LAPS-Microfluidic System, 6th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics, 2012 年 3 月 8 日, 宮城

A. Matsuo, K. Miyamoto, T. Wagner and T. Yoshinobu, Development of Stand- Alone Chemical Imaging System and its Application to Microorganisms, 6th International Symposium on Medical, Bio- and Nano-Electronics, 2012 年 3 月 8 日, 宮城

Carl Frederik Werner, Torsten Wagner, Ko-ichiro Miyamoto, Tatsuo Yoshinobu and Michael J. Schöning, High speed and high resolution chemical imaging based on a new type of OLED-LAPS set-up, *Euroensors XXV*, 2011 年 9 月 4~7 日, ギリシャ, アテネ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bme.ecei.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮本 浩一郎 (MIYAMOTO, KOICHIRO)
東北大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 70447142

(2) 研究分担者

ハン ジュンギョ (HAN, JYUKYU)
筑波大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号: 40455928