

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659923
 研究課題名（和文） 歯科再生医療のための磁性マイクロビーズ使用マイクロ流路型バイオチップの開発
 研究課題名（英文） Development of micro-fluid-path type bio-chips using magnetic micro-beads for dental tissue re-generation medicine
 研究代表者
 平 雅之（TAIRA MASAYUKI）
 岩手医科大学・歯学部・准教授
 研究者番号：60179398

研究成果の概要（和文）：微小電子機械システム技術で作製するマイクロ流路チップと、研究を進めている細胞捕集用磁性マイクロビーズシステムを合体させて、歯科再生医療に役立つ磁性マイクロビーズ使用マイクロ流路型バイオチップの開発を試みた。標的細胞に特異的なビオチン標識抗体と開発中のストレプトアビジン固定磁性ビーズの結合効率を調べた。試作バイオチップ中に抗体標識細胞懸濁液と磁性ビーズ懸濁液を流し、細胞の磁性回収に部分的な成功を納めた。

研究成果の概要（英文）：We tried to produce trial micro-fluid-path type bio-chips using Micro Electro Mechanical Systems (MEMS) technology and magnetic micro-beads under development. We examined binding efficiencies between target cells labeled with biotin-conjugated antibodies and streptavidin-bound magnetic beads. We obtained partial success in collecting target cells after passing solutions containing antibody-biotin-labeled cells and streptavidin-bound magnetic micro-beads through micro-fluid-paths in trial bio-chips.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：歯科理工学

科研費の分科・細目：歯科医用工学・再生歯学

キーワード：歯科医用工学、マイクロ流路、微小ポンプ、2液混合、幹細胞、細胞分画、混合チップ、微小ビーズ

1. 研究開始当初の背景

(1) 血液バイオチップの開発が企業において進んでいて、シリコン製のチップ上に微小な流路や反応室、混合室を設け、一つのチップもしくはデバイスで血液や DNA 等の生体物質が生化学的に分析され始めていた。

(2) バイオチップを用いた細胞の分離回収は、他大学工学部（東京大学の牛田多加志教授、京都大学の小寺秀俊教授、富山大学の鈴木正康教授等）によって試験的に行われていたが、一般に普及するに至らず、国の内外

において早期開発が期待されていた。

(3) 研究代表者は市販の磁性マイクロビーズシステムを用いたマウス間葉系幹細胞の回収の研究（Taira, M. et al., J Oral Tissue Eng. 6(1):33-40, 2008）を行っていた。

2. 研究の目的

マイクロ流路を用いたバイオチップは核酸、蛋白と細胞の捕集用のデバイスとして注目を集めている。一方、歯科界でも、骨髄から間葉系幹細胞を分離・回収するため、バイ

オチップの利用が期待されており、試作を試みることにした。

(1) 蛇腹式混合流路を有する試作マイクロ流路チップに無色及び着色溶液を流し、混合性能に検討を加えた。

(2) 培地に懸濁したアビジン抗体標識単球とストレプトアビジン付き磁性ビーズ溶液を試作マイクロ流路に流し、混合性能に検討を加えた。

(3) 試作ナノフェライト粒子配合共重合体マイクロビーズにストレプトアビジン (SPAV) を結合させ、ビオチン標識 CD14 抗体を結合させたヒト単球 (THP-1 細胞) の磁気回収効率に検討を加えた。市販 4 社の SPAV 磁性マイクロビーズを対照試料とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロ流路 PDMS チップには市販の Y 字式混合チップ (フルイドウェアテクノロジー社) (図 1) と試作蛇腹式混合チップ (バイオコズム社) (図 2: 混合流路は①~④の 4 種類) を用いた。送液にはピエゾ式マイクロポンプ (SDMP302、高砂電機工業) (コントローラー付き) 2 台を用い、1.5ml エッペンチューブに入れた溶液をプラスチックチューブ (内径 0.79mm、外径 2.38mm) でチップに送液した。ポンプの出力は概ね 50% とした (図 3)。

(2) ビオチン標識 CD14 抗体を結合させた (THP-1 細胞) (10^7 個) を緩衝液に懸濁させた。また、ストレプトアビジン付き磁性ビーズ (多摩川精機) を所定濃度で緩衝液に懸濁させた。両液を (1) の実験に即して混和した。磁性スタンド、磁石 (MiniMACS)、専用カラム (ミルテニバイオテク社) を用いて positive selection 法により標識 THP-1 細胞の磁性回収を試みた。

(3) 試作磁性ビーズには多摩川精機 (神奈川県) より提供された COOH ビーズを使用した。当ビーズはナノフェライト粒子を内包したスチレン-グリシジルジメタクリレート共重合体微粒子で構成され、表面のエポキシ基にアンモニアと無水琥珀酸を作用させて外末端に COOH 基を結合させたものである。

溶媒洗浄後、pH7.9 のバッファー溶液中で試作磁性 COOH ビーズにスクシンイミドとカルボジイミドを作用させて活性化エステル化し、recombinant の STAV (Roche Diagnostic, ドイツ) をビーズ 1mg 当たり 2nmol 結合させた後、アミノエタノールでブロッキングした。一部の SPAV 結合試作磁性ビーズは Mo メッシュに載せた後、液体成分を蒸発させ、炭素蒸着し TEM 観察 (H-7100, 日立, 茨木) を行った。対照の 4 種類の市販 SPAV 磁性ビーズには STAV 磁性粒子 (ミルテニバイオテク、ドイツ) (略称 MB) ; My One STAV T1 (Invitrogen, 米国) (略称 T1) ; STAV 磁性粒子 (Roche Diagnostic, ドイツ) (略称 RC) と STAV 磁性粒

子 (MERCK、米国) (略称 MK) を用いた。

バッファー中に懸濁したヒト単球様 THP-1 細胞 (10^7 個) にビオチン標識 CD14 抗体 (Acris Antibodies、ドイツ) を結合させた。抗体希釈濃度は 1/250 とし 4°C で 10 分間作用させた。

磁性回収実験：市販 1 社 (ミルテニバイオテク、ドイツ) の磁性スタンド、磁石 (MiniMACS)、専用カラムを用いて positive selection 法により標識 THP-1 細胞 (10^7 個) の回収を試みた。磁石で誘引された細胞は専用注射筒に入れたバッファーで押し流し回収し、細胞培養液に懸濁し直して Cell Counting Kit 8 (同仁化学、熊本) を用いて 1 時間培養し、呈色反応から細胞生存率を調べた。磁性ビーズの細胞回収率は THP-1 細胞の相対的な細胞生存率から評価した。

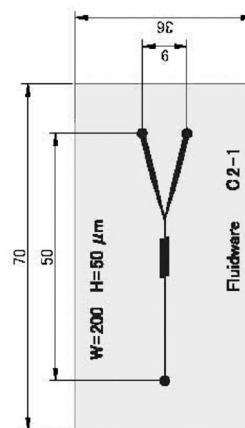


図 1 市販の Y 字式混合チップ

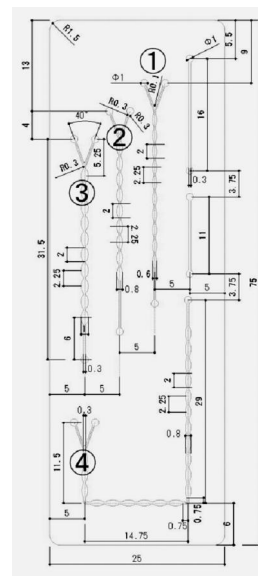


図 2 試作蛇腹式混合チップ

4. 研究成果

(1) 2 液混合：PBS(-) 溶液 (無色) とトリパ

ンブルー染色液（有色）との混和は図1のY字式混合チップと図2の試作蛇腹式混合チップ①～④で簡単に成功した(図4)。マイクロポンプの出力を下げ、送液量（圧力）を下げると、流路の長い蛇腹式混合試作チップ（図2）使用時に、2液体（細胞液と磁性ビーズ液）の混合効率が高まると考えられた。

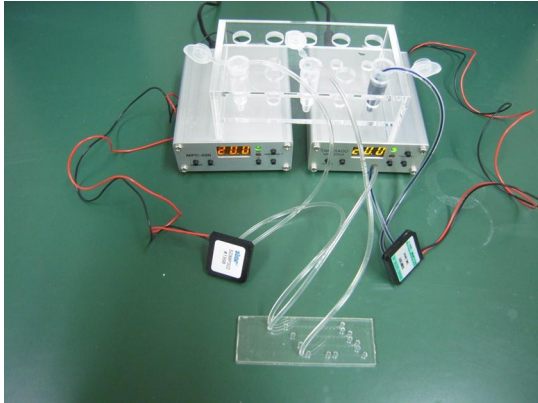


図3 マイクロ流路バイオチップの装置全景

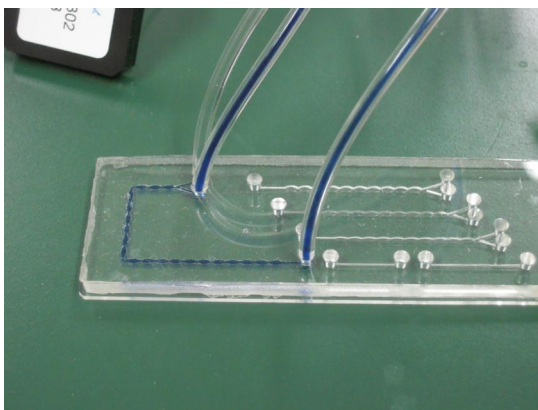


図4 2液混合状況（近景）

(2) 細胞とビーズ混合：ビオチン標識 THP-1 細胞とストレプトアビジン付き磁性ビーズの結合は、いずれの場合も、2液の送液スピードが早すぎ、混合効率が低かった（部分的成功）。標識 THP-1 細胞と磁性ビーズの混合には、チップ上の流路長の増加の他、本実験の初期混合後、別の独立した混合装置（例えば、振動式のハイブルくん（フルイドウェアテクノロジー社））（図5）に移し、機械混和することも有効と考えられた。

(3) 試作磁性ビーズは概ね $0.2 \mu\text{m}$ (=スケールバー長さ) の（サブ）マイクロサイズを有し、内部には粒径が概ね 10nm のナノサイズ・フェライト粒子が数個から 20 個弱含まれることが確認された（図6）。

STAV 結合試作磁性ビーズの回収効率は市販 4 社の STAV 磁性ビーズの回収効率が有意

に上回ることが確認された（表1）。磁性ビーズのリンカー部分が長く蛋白（STAV やビオチンとの結合）の立体配位障害が小さいことが一因と考えられた。試作磁性ビーズは幹細胞の磁気回収にも有用と類推された。

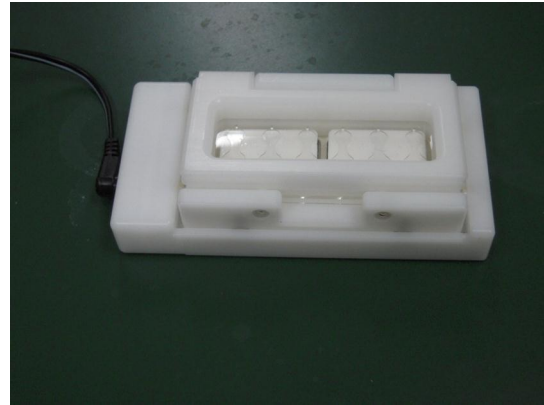


図5 振動式混合装置（ハイブルくん）

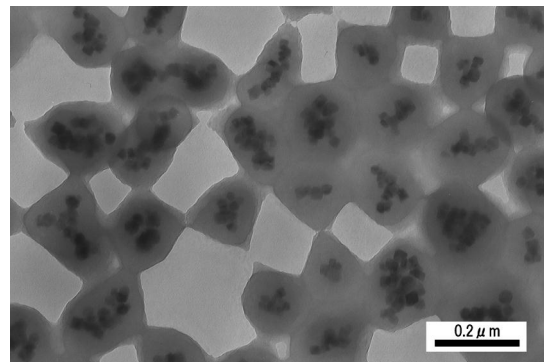


図6 SPAV 結合試作磁性ビーズの TEM 像

表1 STAV 結合磁性ビーズの THP-1 回収効率率 (%) (n=3)

	平均値	標準偏差
試作	35.8	3.3
MB	9.7	4.6
T1	6.9	4.5
RC	18.7	9.7
MK	5.9	3.5

(4) ピエゾマイクロポンプはマイクロ流路バイオチップの送液に必要不可欠であったため、その内部を図7に引用した。別に、ハミルトン注射筒とマイクロシリンジ式ポンプを送液に用いたが、ピエゾマイクロポンプの方が送液効率と携帯性の点で優れていた。

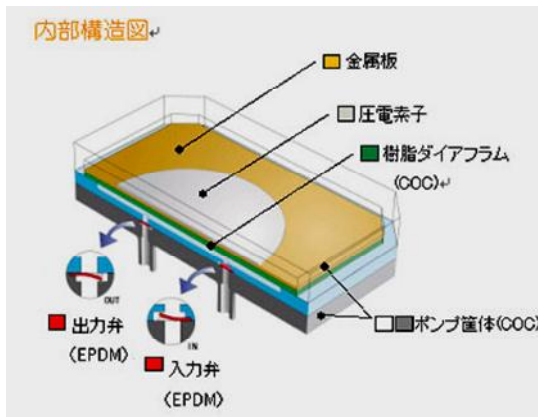


図7 ピエゾマイクロポンプの内部

出典：

<http://www.takasago-elec.co.jp/pdf/catalog/SDMP302%20306.pdf>

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4件)

- ① Hatakeyama, W., Taira, M., Kihara, H., Sasaki, M., Kimura, S. and Kondo, H.: Subcutaneous tissue reactions against nano-apatite collagen composites. Nano Biomedicine 4(2): 118-124, 2012 査読有
- ② Taira, M., Hatakeyama, W., Kihara, H., Kondo, H., Ueda, K. and Narushima T.: Quantitative analyses of osteogenic-differentiation-related gene expressions in human osteoblasts-like cells (SaOS-2) cultured on hydroxyapatite and titanium. J. Oral Tissue Eng. 10(1): 34-41, 2012 査読有
- ③ Taira, M., Kagiya, T., Sasaki, M. and Kimura, S.: Quantitative real-time RT-PCR analyses of DNA-damage-recovery-related gene expressions of mouse macrophage-like cell line RAW264 when exposed to IC50 nickel ions. Nano-Biomed. 3(2), 294-299, 2011 査読有
<http://www.nanobio.jp/n3-2-7e.html>
<http://www.nanobio.jp/n4-2-7e.html>
- ④ Taira M., Shimoyama Y., Kagiya T., Sasaki M., Nezu T., Harada H., Kimura S.: Proteome analyses of human macrophages exposed to low cytotoxic IC90 copper (2+) ions. Dent Mater J.

30(3):293-299, 2011 査読有

<http://dx.doi.org/10.4012/dmj.2010-088>

[学会発表] (計12件)

- ① 平 雅之, 畠山 航, 鬼原 英道, 近藤 尚知. マイクロ流路チップを用いた細胞と磁性ビーズ溶液の混合に関する研究. 第61回日本歯科理工学会学術講演会. 東京都, 2013年4月13日
- ② 根津尚史, 佐々木かおり, 齋藤設雄, 平雅之. 口腔バイオフィルム構成多糖の凝集状態のQCMによる解析. 第60回日本歯科理工学会学術講演会. 福岡市, 2012年10月13日
- ③ 畠山 航, 平 雅之, 鬼原 英道, 近藤 尚知. 多孔質アパタイト粒子コラーゲン複合体によるラット頭蓋骨クリティカルサイズ骨欠損部における骨再生の試み. 第60回日本歯科理工学会学術講演会. 福岡市, 2012年10月13日
- ④ 畠山 航, 平 雅之, 鬼原 英道, 近藤 尚知. ナノアパタイト (nano-SHAp) の材料学的評価並びに生体反応評価. 第59回日本歯科理工学会学術講演会. 徳島市, 2012年4月14日
- ⑤ 平 雅之: THP-1細胞を用いたチタン微粒子、銅イオンとTEGDMAモノマーの細胞障害性の評価. 日本動物実験代替法学会 第24回大会. Sendai, 2011年11月12日
- ⑥ 根津尚史, 佐々木かおり, 齋藤設雄: バイオフィルム関連高分子マトリックス中の薬剤透過性の定量評価の試み. 第58回日本歯科理工学会学術講演会. 郡山, 2011年10月23日
- ⑦ 齋藤設雄, 佐々木かおり, 根津尚史, 平雅之: チタンへの金蒸着がチオール化合物の付着に及ぼす影響. 第58回日本歯科理工学会学術講演会. 郡山, 2011年10月23日
- ⑧ 平 雅之: TEGDMAに曝された時のTHP-1単球の異物代謝並びに炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現評価. 第58回日本歯科理工学会学術講演会. 郡山, 2011年10月22日
- ⑨ 佐々木かおり, 齋藤設雄, 根津尚史, 平雅之: 薬剤徐放性コラーゲン基材の調製

—架橋法による架橋効率の比較— 第58
回日本歯科理工学会学術講演会. 郡山,
2011年10月22日

- ⑩ 鍵谷忠慶, 平 雅之, 安藤禎紀, 藤村
朗: マクロファーが銅イオンに暴露さ
れた時の microRNA の発現について. 第
54 回歯科基礎医学会学術大会. 岐阜,
2011年10月2日
- ⑪ Saitoh, S., Sasaki, K., Nezu, T. and
Taira, M.: Histological and TEM
observation of subcutaneous tissues
exposed to particulate pure metals.
International Dental Materials
Congress 2011 (IDMC2011). Soul,
Korea, 2011年5月28日
- ⑫ Nezu, T., Sasaki, K., Saitoh, S. and
Taira, M.: Diffusion of an
antimicrobial acriflavine through a
concentrated solution of hyaluronic
acid as a matrix component of biofilms.
International Dental Materials
Congress 2011 (IDMC2011). Soul,
Korea, 2011年5月28日

[その他]

ホームページ等

<http://hitech-d.iwate-med.ac.jp/dmst/index-j.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平 雅之 (TAIRA MASAYUKI)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号:60179398

(3) 連携研究者

根津 尚史 (NEZU TAKASHI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号:40264056
佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号:40187133