

論文題目 生体機能を利用した高機能バイオマイクロ化学システムの開発に関する研究

氏名 田中 有希

【はじめに】

近年、化学反応システムを半導体素子のようにガラスやシリコン、プラスチック基板から作製したマイクロチップ上に集積化しようとする研究が世界的に注目されている。この技術は μ -TAS (micro total analysis systems) などと呼ばれ、電気泳動による DNA 解析を目指した研究がよく知られている。しかし、当研究室では、電気泳動に頼らない独自の方法論を開発し、圧力による流体制御技術と、ガラス製マイクロチップを用いることで、マイクロチップを汎用的な化学実験の場として利用している。

本研究では、このシステムをさらに高機能化するため、生命の機能を組み込むことでマイクロ化学システムの高機能化を目指しシステムの開発を着想した。生命機能を利用し、高機能マイクロ化学システムを実現しようとする研究は世界的にほとんど行われておらず、これを開発することは基礎科学的にもまた応用研究としても極めて有意義である。例えば、酵素・抗体などの生体分子や細胞は、生体内で非常に複雑な反応を高効率に行っている。これらを利用することにより、特異性の高い反応を効率的に進め、検出や分析に用いること、通常の化学合成では合成することが難しいような抗生物質などの複雑な化合物や光学異性体、あるいは機能性タンパク質などを効率的に合成することが可能である。

これらをふまえ、生命機能、具体的には酵素および細胞を用いたバイオリアクター・分析デバイスのマイクロチップへの集積化を目標とした。これを実現するためには、生化学的な反応を行わせる場としてのチップ内微小空間の特性を明らかにし、空間特性を活用したチップ内で酵素反応を効率的に制御するため、あるいは細胞の機能を発現させたまま生命を維持するための基礎的な技術開発など、新たな知見と技術の蓄積が必要である。

そこで本研究では、マイクロバイオケミカルデバイス実現のための基盤技術として、マイクロ空間における温度による酵素反応制御技術の開発と、酵素反応の解析、マイクロチップ内細胞培養と細胞機能制御法などについて研究し、高機能なマイクロ化学システムを実現した。

【1. マイクロ酵素反応システム】

酵素反応を正確に制御するために最も重要な因子として、反応温度の制御が挙げられる。マイクロチャンネル内部などの液相微小空間では、体積が小さいため、熱容量が小さい、均一場を作りやすい、といった特性がある。これらの特性は、温度の高速制御には非常に有利であるが、温度測定という点においては、系に影響を与えずに温度を計測することが非常に困難であるという欠点がある。

そこで、マイクロチップに適した温度測定法と温度制御法を開発し、酵素反応速度の制御を試みた。さらに応用として超高速 PCR による DNA の増幅を実現した。

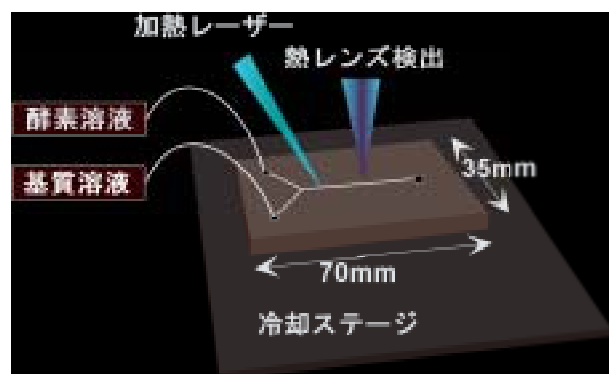


図1 実験システム概要

1-1. マイクロチャンネル内温度計測法の開発

マイクロチャンネル内の溶液温度を計測する場合、従来の接触型の温度計では、系の温度を変化させてしまう。そこで、蛍光色素ローダミン 3B の蛍光の温度消光を利用して、非接触で溶液の温度を計測する方法を開発した。マイクロチャンネル内の溶液温度を、系に影響を与えることなく、50m 秒以下の時間で、空間分解能 $1\mu\text{m}$ の精度で測定することに成功した。本法を以下の研究において温度モニタリングに利用した。

1-2. レーザーによる高速反応温度制御

現在、微小反応場の温度制御には、微細加工技術によるヒーターやクーラーが用いられており、マイクロチップ全体を加熱・冷却するという方法が試みられているが、この方法では、チップ自体の熱容量のため、瞬時に温度を変えることができないなど、液相微小空間の特徴が十分に活かされていない。また、集積化学システムにおいては、一枚のマイクロチップ上で部位ごとに反応や検出などの異なる機能をもたせる必要があるため、局所的な温度制御法が必須である。そこで、本研究では、光の照射によって生じた励起状態の分子が無輻射過程を通じて失活する際に熱を発生する光熱変換効果に着目し、レーザーを微小空間内に照射することによる独自の温度制御法を開発した。

マイクロチップ上に微細な光吸収体を作製して、非常に小型の可視光レーザーを用いた場合でも高速な酵素反応制御を実現できることを示した¹。さらに、溶媒である水が大きな吸収をもつ 1500 nm 付近の赤外レーザー（出力 100 mW）を用いて溶媒を直接加熱し、約 350°C/秒という加熱速度を実現した。この場合の加熱体積は 10nL であり、比表面積が大きく体積が小さいので、周囲の熱浴（室温のマイクロチップ）へのエネルギーフラックスが大きくなる。すなわち、加熱用レーザーの照射を止めると、周囲への急速な熱拡散により、0.1 秒以下という短時間で室温まで直ちに冷却される。また、レーザーの出力を周期的に変化させて温度サイクラーとして利用できることを示した³。

1-3. PCR システムへの応用

本研究で得られた高速温度制御法と温度計測法を用いた温度サイクラーは、高速応答が必要な系に対して、非常に有効な方式である。そこで、ゲノム解析などに必須の PCR をマイクロチップ上で実現することを目指した。従来、必要とされる試料量は 1 μ l、30 サイクル完了までの時間は最低 20 分であったが、これを大幅に改善し、必要試料量 5 nl（DNA2 分子を含む）、30 サイクル 5 分という条件での PCR を実現した。

1-4. 酵素反応速度への空間サイズの影響

酵素反応の動力学的な解析の結果、マイクロチップ内ではペルオキシダーゼ反応が通常のバルクの系に比べて 2 倍程度に高速化していることを見いだした²。反応空間のサイズ依存性、測定法の影響、反応種の壁面への吸着などについて詳細に検討を行ったが、これらの因子の影響は限定的であると考えられ、未だメカニズム解明には至っていない。しかしながら、最近、世界中の他の研究グループからも本実験の再現性を報告する結果が次々に報告されており注目を集めている。

【2.細胞を用いたマイクロ化学システム】

次に、反応素子として細胞そのものを用い、有用物質の物質生産・薬物候補物質や毒物のアッセイに用いることを検討した。マイクロチップ内の微小空間は、その空間サイズが生体内の組織構造のサイズに極めて類似している他、血管系のような流体ネットワークを構築することが可能であり、細胞を用いるのに

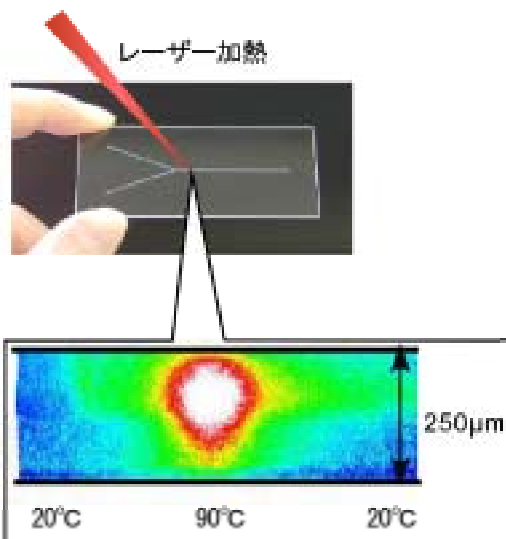


図2 マイクロチャネル内の温度分布

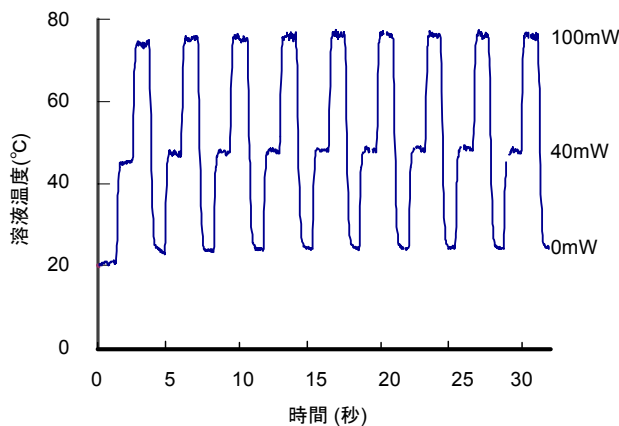


図3 赤外レーザーを用いた温度サイクラー

非常に適していると考えられる。しかしながら、これまでにこれらを組み合わせた研究は例が無い。そこで、細胞の機能を用いた化学システムを実現するため、細胞の生育と機能に大きな影響を及ぼす以下の事柄について検討した。

2-1. ガラス表面のコーティング・パターンニング

動物細胞は固体表面に接着することにより初めて増殖して様々な活性を示すため、細胞を接着させたい固相表面をタンパク質などでコーティングする必要がある。そこで、ガラスマイクロチップ内部に細胞を培養する場合に最適なコーティング剤およびその条件、物質生産などの機能を発現させるのに適した条件の探索を行った⁶。フィブロネクチンは、細胞の伸展には有効なコーティングであるが、物質生産機能の保持には適さず、また、本研究のように流れのある系の中では接着力が不足する。コラーゲンは細胞の接着・物質生産能の保持の両方に有効なコーティング剤である。この結果を、以下の研究に利用した。

2-2. 養分・酸素供給システム

マイクロチップ空間は、微細流路からなるため、血流と同様、流れがなければ、溶存酸素および栄養成分が欠乏しやすく、老廃物濃度が上昇しやすくなる。そこで、マイクロ流体制御技術を活用し、マイクロ培養槽に対して常に安定した物質供給を実現するような精密な送液制御系を構築し、培養チップに新鮮な培地を供給するシステムを考案した。これにより、生体外での培養が難しく、通常の培養方法では物質合成その他の機能を正常に維持することが困難な初代培養肝細胞をマイクロチャンネル中で、良好に培養することに初めて成功した⁴。タンパク質合成・老廃物分解機能も正常に維持できていることを確認した。

2-3. 剪断応力による細胞ストレスの評価

マイクロチャンネル内はレイノルズ数が小さく層流条件であるため、速度分布によって剪断応力が生じ、細胞に対してストレスとなると予想される。そこで、流体制御技術を利用して、培地の流速や粘度を変化させ、剪断応力が肝細胞の増殖や形態、物質生産量に及ぼす影響を考察した。図6において、剪断応力 1.1 Pa の条件で細胞の機能は大幅に低下していることがわかる。このように、細胞にダメージの少ない送液条件を明らかにし、血管内における毛細静脈流以下の剪断応力（約 0.2 Pa）下で最も良好に物質生産することを示した⁵。血管系細胞以外を用いて、剪断応力の影響を系統的に考察した例はこれが初めてである。

2-4. マイクロ細胞システムへの応用

マイクロチップの場合には、培養槽だけではなくその下流に様々なプロセスを組み合わせることが容易であるために、一枚のチップ上にいくつかの実験プロセスを組み合わせることも可能である。このことを活用して、薬物の副作用などによる肝毒性のアッセイシステムを開発した。

【まとめ】

当研究室で培ってきたマイクロ流体制御や MUO (Micro Unit Operation) などの独自の的方法論を利用する



図4 細胞培養マイクロチップ

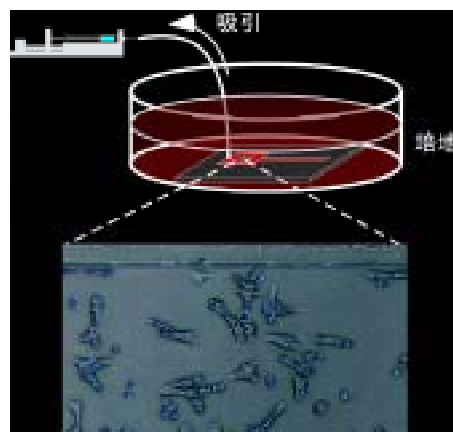


図5 養分・酸素供給システム

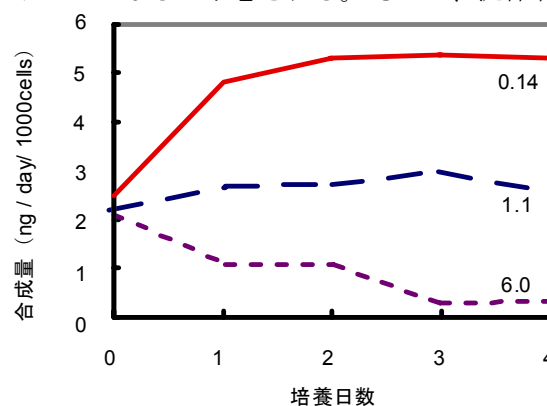


図6 剪断応力(Pa)とアルブミン合成能

ことにより、生命機能を積極的に利用し、高機能マイクロ化学システムを実現しようとする研究を着想した。この着想に基づき、本研究では、マイクロチャネル内の高速・非接触な温度計測、高速かつ高効率な温度制御とそれを用いた酵素反応制御、マイクロチップ内で機能を維持したままの細胞培養などを新しく実現し、それらを用い、組み合わせることによって、微小空間内における酵素反応の加速現象、細胞の機能に対する周囲の環境の影響などを新しく見出した。

今回実現された高速温度制御法は、酵素反応の制御だけでなく、一般の化学反応、反応を高速に on/off を切り替えたい場合や局所的に反応を限定する場合、温度変化に伴う反応中間体の生成を抑える場合などに有効であり、化学の集積化における反応制御法として極めて有力であると期待できる。

一方、細胞を用いたマイクロデバイスについては、動物実験の代替法の有効な候補、あるいは、従来の細胞を用いた実験と生体個体を用いた実験の中間に位置付けられる新たな実験ツールとなることが十分期待できる。また、細胞の培養条件のスクリーニングデバイスとして利用し、自然な状態で培養するだけでなく、たとえば物質生産機能のみを高く維持するような条件を見出し、バイオリクターに応用するといったことも可能である。実際にマイクロバイオリクターに関する農林水産省のプロジェクトが本年度よりスタートした。今後、さらに微小流体制御技術と微細加工の両方を活用し、マイクロチップ内に複数の細胞種からなる複雑な微細組織構造を持ったデバイスを実現することも可能であると考えている。以上のように生命システムに特有なマイクロ空間を人工的に加工制御することで新しい生命利用技術を拓く基礎研究として位置づけることができる。

【発表状況】

- 1)Y. Tanaka, M. N. Slyadnev et al., *J. Chromatogr. A*, **894**, 45 (2000)
- 2)Y. Tanaka, M. N. Slyadnev et al., *Anal. Sci.*, **17**, 809 (2001)
- 3)M. N. Slyadnev, Y. Tanaka et al., *Anal. Chem.*, **73**, 4037(2001)
- 4)Y. Tanaka, K. Sato et al., *Electrophoresis*, in press.
- 5)Y. Tanaka, K. Sato et al., *Journal of Biochemistry*, submitted
- 6)Y. Tanaka, K. Sato et al., *Lab on a Chip*, in preparation.