

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 14 年度博士課程進学  
氏名 徳山 孝仁  
指導教員 安保 充

論文題目 細胞を用いた高感度マイクロバイオアッセイシステムの開発

### 緒言

生命科学分野において、細胞を扱う実験は生命の複雑さを反映した応答を得る手段として欠かせないものであり、特に細胞を用いたバイオアッセイは、様々な分野で用いられている。さらに近年では医療、創薬などの分野を中心に希少な生物の細胞や個々の生命体固有の細胞など、少数しか存在しない細胞を用いた特異的かつ高効率高感度なアッセイが求められている。また、細胞が本来存在している空間的スケールや液流のある環境といった生体環境の再現も望まれている。しかし、現在のディッシュやマイクロタイタープレートを使用する系ではこれらの実現には限界があった。現在、この壁を越える新たなアプローチとして、数センチ角のチップ上に細胞保持部、培地や試薬を流す流路、あるいは有機反応部、検出部などを集積する、マイクロチップテクノロジーが世界的に注目されはじめている。細胞を用いた一連の実験系を高度に集積することにより、実験に使用する細胞や試薬量の少量化、アッセイ効率の向上など、実験系が飛躍的に効率化することが期待されている。

マイクロチップ上での細胞を用いたバイオアッセイに求められる要素技術として、マイクロチップ上に細胞が活性を維持して保持できていること、細胞の様子が直接観察/観測できること、細胞放出物が測定できることが特に重要であると考えられる。また、細胞は、大きく接着細胞と浮遊細胞に分けることができ、それぞれの細胞系に重要な生体情報が含まれている。しかしこれまでマイクロチップ上に細胞を保持してのアッセイにおいて、細

胞自身の接着力により流路内壁に固定可能な接着細胞が使用され、浮遊細胞を保持した例はほとんど無い。そこで本研究では、膜を用いて浮遊細胞をマイクロチップ上に保持する機構を開発し、細胞の直接観察、細胞放出物の高感度測定が可能なバイオアッセイシステムを構築した。さらに、そのままでは検出不可能な放出物を高感度検出可能な蛍光物質へ誘導体化する反応を集積することにより、汎用的な高感度高効率マイクロバイオアッセイシステムの開発を目指した。

### マイクロチップの作製

マイクロチップの基板材料として、光学分析を行うことから光学特性に優れていること、加工が容易であること、薬品耐性があることなどが求められる。そこで本研究ではシリコンエラストマーの一種であるポリジメチルシロキサン (PDMS) をチップ基板材料として使用した。ガラス基板上にフォトリソグラフによって高さ数十  $\mu\text{m}$  の凸型構造を作製し、PDMS の鋳型として用いた。さらに造形した複数の PDMS シートを積層することで三次元的流路構造を持つマイクロチップを構築した。送液はマイクロシリンジポンプを用いて行った。

### 細胞保持機構

本研究では PDMS が造形や接着が容易で、構造物を挟み込むことが可能な素材であることに着目し、マイクロチップ上に浮遊細胞を保持するための細胞保持機構をデザインした。PDMS の層と層の間に細胞が通過できない孔径のメンブレンを配置し、上層から下層へメンブレンを通過する縦の流路を設計した。さらにメンブレン上部に細胞が留まる空間を設けることで、フィルタリングによる細胞保持システムを完成させた。使用するメンブレンとして透明なものを選択することにより、細胞染色による評価など、倒立顕微鏡による観察が可能となる。実際に容量数百 nl 程度の円筒形細胞保持空間を持つマイクロチップを作製し、浮遊細胞である急性白血病細胞 HL-60 (直径 10~15  $\mu\text{m}$ ) を細胞保持部に導入して細胞を観察した。培地を 1  $\mu\text{l}/\text{min}$  で送液した結果、細胞が溶出することなく保持することに成功した。

微小流路での送液においては、溶液の混合、液温の変化などわずかな環境の変化により気泡が発生し、細胞の活性や分析に悪影響を与える。特に本研究で用いる細胞保持機構の場合、一度混入した気泡を除去することは困難である。そこで、流路を親水処理し、流路に接する疎水性の気泡除去路を設けることにより、細胞保持空間の手前で気泡を除去する機構を開発した。本研究では流路の PDMS 表面を血清で処理することで親水処理を行い、気泡除去路は酸素プラズマ処理をした後、フッ素樹脂 (サイトップ、旭硝子) をコートした。これにより、数日以上送液に耐えられる気泡除去機構が完成した。また比較的高濃度 (20%) の FBS を含む培地を送液した場合においても、数回のアッセイに耐えることができた。

## 細胞生存活性/毒性試験チップ

活性を維持した状態で浮遊細胞を保持し、アッセイ中の細胞自体の観察、および細胞溶出物をリアルタイム測定可能なバイオアッセイシステムの構築を目指した。ここでは細胞生存活性/毒性試験をマイクロチップ上に構築した。マイクロチップは図1のように、細胞保持部の上流に気泡除去部を持ち、下流において蛍光スペクトル測定が可能なフロー型のシステムとした。また、倒立顕微鏡で細胞の観察を行うため、細胞保持に使用するメンブレンは透明なものを使用した。細胞生存活性の測定は細胞内の酵素活性に応じて蛍光物質に還元されるレサズリンを培地に添加し、細胞保持部を通過した溶液の蛍光の増減を流路上で検出することによって行った。マイクロチップ上での検出において、小スケール化により検出部の容積は非常に小さくなる。このため検出には空間分解能が高く、高感度な検出器が必要となる。そこで、本実験では蛍光検出には CCD 検出器を接続した蛍光顕微鏡を使用した。このシステムを用いることにより、チップ内の細胞の生存活性をリアルタイムに検出することに成功した。さらに毒性物質添加時には、生存活性が低下していく様子を観察することが出来た。また、細胞がダメージを受けた後に Calcein-AM 染色を行った結果、生細胞の減少をマイクロチップ上で直接観察することができた。これにより浮遊細胞を保持したバイオアッセイの構築に成功した。本システムは細胞試験で多くの場合に必要となる細胞の直接観察、培地中に放出された物質の測定などに利用できると考えられる。

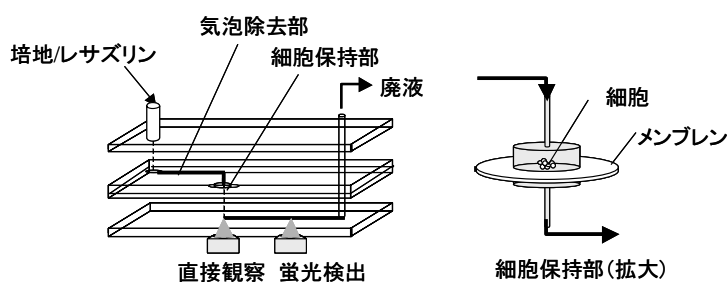


図1 細胞生存活性測定チップ

## ヒスタミン遊離/遊離抑制試験チップ

一般的な細胞放出物測定では、上記レサズリンのように放出物質自体が蛍光を持つことは希である。このため多くの場合、放出物を測定可能な物質に誘導体化することが要求される。そこで、細胞の保持に加えて細胞放出物の誘導体化機構を集積したマイクロチップを開発した。ここでは、肥満細胞を保持し、刺激に応じて放出されるヒスタミンを蛍光誘導体化して測定できるマイクロチップ（図2）を作製し、ヒスタミン遊離/遊離抑制試験を行った。ヒスタミンは刺激に応じて肥満細胞から放出されるメディエータの一種で、アレルギー反応では中心的な役割を果たす。これを定量することにより、刺激物質のアレルギー性の程度を知るヒスタミン遊離試験を行った。また、抗アレルギー薬を共存させることによる応答の減少率を測定することによりドラッグスクリーニングに利用される、ヒスタ

ミン遊離抑制試験を行い、構築したシステムの評価を行った。使用細胞として初代細胞であるラット腹腔肥満細胞（浮遊細胞）を用いた。肥満細胞をマイクロチップ内に保持し、これに刺激物質(C48/80)を作用させた。細胞保持部の下流となる層で、刺激に応じて遊離したヒスタミンを  $\sigma$ -phthalaldehyde と混合することにより、特異的に蛍光誘導体化した。これを最下流で蛍光顕微鏡を用いて検出することにより遊離ヒスタミンのリアルタイム定量を行うことが出来た。さらに、抗アレルギー薬クロモグリク酸存在下でヒスタミンの遊離が抑制されることも検証でき、ドラッグスクリーニングにも使用できるシステムとなった。

マイクロチップ上に本アッセイを構築したことにより、従来法に比べ使用細胞数にして 1/20 程度、アッセイ時間はおよそ半分に短縮させることができた。また、細胞が生存したまま細胞溶出液を有機反応に供することができるため、従来不可能であったリアルタイム測定を行うことに成功した。

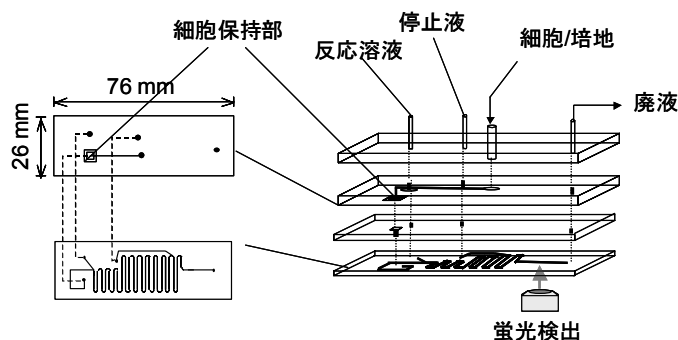


図2 ヒスタミン遊離試験チップ

## 結言

本研究では、細胞のチップ内保持、細胞の直接観察、溶出物の誘導体化、検出といった、細胞を使用したバイオアッセイに要求される機能をマイクロチップ上に構築することに成功した。また、実際にマイクロチップ上に構築した高感度バイオアッセイシステムにおいて、従来法に比べ使用細胞数や試薬量の減少、アッセイ時間の短縮や作業工程の簡略化といった大幅な効率化を達成することができた。また、これらのシステムはフローシステムとして集積しているため、リアルタイム測定が可能であることも大きな特徴である。

さらに、これまでマイクロチップ上に保持することができなかった浮遊細胞の保持を可能とした。接着細胞以外の細胞が利用できるようになっただけでなく、細胞種を選ばないアッセイにおいては、接着過程を必要としない浮遊細胞の利用により、作業の簡略化や試験時間の大幅な短縮が可能となる。

本システムは目的に応じて細胞や反応系を変えることにより、様々なアッセイに応用できる。たとえば個々の患者由来のわずかな初代細胞を用いて、前培養なくアッセイが可能であると考えられることから、オーダーメイド医療などへの展開も期待される。