

課題名 C-0803 人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発に関する研究

課題代表者名 持立 克身（独立行政法人国立環境研究所環境健康研究センター フェロー）

研究実施期間 平成20～24年度

累計予算額 93,451千円（うち24年度16,200千円）
予算額は、間接経費を含む。
平成20年度はナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

本研究の キーワード 擬似マトリックス、疎水化、表面弾性波、LiTaO₃、誘電率、肺胞上皮、
タイトジャンクション、過酸化水素、微小流体、オンチップ・インキュベーション

研究体制

- (1) 人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発に関する研究
(独)国立環境研究所
- (2) SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究：細胞培養用 SH-SAW デバイスの開発
(弘前大学大学院理工学研究科)
- (3) SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究：SH-SAW デバイス上における上皮組織の構築と
組織傷害に伴う信号変調の解析
(弘前大学農学生命科学部)
- (4) 細胞間接着因子E-カドヘリンの発現を強化したヒト細胞培養株の樹立
(東京電機大学理工学部)
- (5) SAWバイオナノ協調体用微小流体システムの設計製作に関する研究
(東京電機大学総合研究所)

研究協力機関

(株) リバーエレテック

研究概要

1. はじめに(研究背景等)

環境中には多くの化学物質が存在し、また、多くの化学物質が新たに製造・使用されようとしていることから、化学物質の安全性、あるいは、医薬品等の副作用を迅速に評価することは最重要課題の一つである。代表的な化学物質の影響評価手法には、曝露を受けた組織や細胞を採取・破碎し、その後、目的成分を抽出・分離・分析する方法がある。しかしこれには、結果を得るまでに労力と時間が掛かり、侵襲的であり、暴露装置や分析装置等、多種類の大きがかりで高額な周辺装置が必要となる。他方、バイオアッセイ法には、化学発光法を用いて特定遺伝子の発現や代謝全般への影響で評価する方法、あるいはミジンコ等の微生物の行動観察、微生物の発光酵素の減衰から毒性を評価する方法等が開発され、前者に比べればいずれも安価で成果を上げているが、影響評価が限定的である欠点はぬぐえない。現時点では、より高い確度をもって判定するには、動物実験に頼らざるを得ない。動物実験は高い信頼性を持つ一方で、有意な結論を得るには、個体差や定量性に十分に留意する必要がある。最近では、倫理面から動物実験はできるだけ少なくしようとする動きが、国際的には加速されつつある。

近年、細胞・組織レベルの機能を計測するバイオセンシング技術が発展して来ている。細胞は生命活動の最小単位で、細胞の集合体である組織は細胞の高度機能発現のための構造であり、生体が外部から受ける種々の刺激(化学的・物理的刺激)に対して初期に応答をする。この初期反応応答を捉えることができれば、種々の刺激が生体へ与える傷害や効能を短時間で評価する方法へと発展させることができる。即ち、従来型の抗体や酵素を用いた抗体型/酵素型バイオセンサのように、単に特定物質の計量を行うのではなく、環境汚染物質や医療医薬品、化学物質、環境汚染物質等が生体に与える影響を「細胞や組織に対する機能的・構造的変化」として計測する次世代バイオセンサ(バイオナノ協調体)の構築が可能となる。このバイオセンシング技術では、細胞が発信する信号をその場で計測するために、デバイス上で細胞・組織を培養するなど、培養系と検出系の一体化によるモニタリング技術が求められる。このような社会情勢と測定技術が抱える問題点を考慮し、平成15-19年度に「バイオナノ協調体による有害化学物質の生体影響の高感度・迅速評価技術の開発」プロジェクトを開始し、斬新な新規概念に基づくバイオセンサが原理的に可能であることを証明した。

2. 研究開発目的

本研究では、表面弾性波(SAW: Surface Acoustic Wave)に着目した。SAWは表面にエネルギーが集中しているため表面性状により伝搬特性が変化する。特に水平せん断型表面弾性波(SH-SAW: Shear Horizontal SAW)は水溶液中でもエネルギーの減衰が少ないため、細胞培養液中でのセンシングが可能である。このため、SH-SAW伝搬面に細胞を培養し、細胞の存在状態に起因するSH-SAW伝搬特性の変化を捉えることができれば、複合した環境有害因子が細胞・組織に与える影響をリアルタイムに検出できるバイオセンサとなり得る。現在、超音波を用いた生物診断・評価は広く検診などに利用され、細胞に対して無害と考えられているので、バイオセンサへの適用にはさしたる問題を抱えていない。本研究では、SH-SAWを用いたバイオナノ協調体開発の一環として、細胞培養目的のSH-SAWデバイスの設計・性能評価、及び、SH-SAW伝搬面に培養した細胞の存在状態に起因するSAW信号の変調について解析する。

環境汚染物質が生体に与える影響を「細胞や組織に対する機能的・構造的変化」として計測し、生体影響評価を行う新規バイオセンサとして、「SH-SAW バイオナノ協調体」を、第(2)及び(3)章で検討する。影響評価を行う細胞としては、大気汚染物質の代表的標的組織の一つである肺胞上皮由来の不死化肺胞2型上皮細胞を用いる。また、大気汚染物質のモデル化合物として、過酸化水素を選択し、酸化的刺激下における肺胞上皮組織の傷害を、SH-SAWの変調信号として検出する。

SH-SAW 肺胞上皮協調体を培養し、信号計測を行うにはCO₂ インキュベータ等の周辺装置が大きすぎて、このままでは実用化に至らない。そこで第(5)章では、微小流体デバイスを用いて、SH-SAWデバイスを収納するオンチップ・インキュベーション・システム(OCIS)を開発する。OCISにパッケージされたSAWチップ上に、影響評価を行う肺胞2型上皮細胞を播種・長期培養し、生体影響評価が可能か検証する。尚、OCISによるバイオナノ協調体のコンパクトかつポータブル化によって、周辺装置は簡略化され、外部との電氣的接続も簡素化されることが期待できる。また、工場等での一貫生産によって完成品がユーザの元に搬送され、速やかに分析に供することも可能になると考えられる。

SH-SAWバイオナノ協調体が機能するには、SH-SAW伝搬面における播種細胞の接着を安定確保することが必須である。第(1)章ではそこで、SAWチップに用いるLiTaO₃チップの表面改質の疎水化、及び、疎水化したLiTaO₃に適合するた擬似マトリックスストリックス、即ち、疎水性側鎖Rの構造を検討する。また、SH-SAWチップ上における上皮組織の長期培養に伴う形態変化等についても検討する。

SH-SAWの信号変調がどのような細胞構造の変化に起因するのか明らかにしておくことは、種々の大気汚染物質によるSH-SAWの信号変調の生理学的意味を理解する上で重要である。第(4)章ではそこで、SH-SAW伝搬波に感応することが想定されるであろう細胞-細胞間結合、もしくは、細胞-基質間結合に関与する接着受容体をヒト上皮細胞に遺伝子導入し、安定発現株を確立して、SH-SAWの信号変調の解析に役立てることを目指す。

以上のサブテーマを分担・遂行することで、SH-SAWバイオナノ協調体を用いた環境汚染物質に対する生体影響評価法の実用化に向けて、更に前進を図る。

3. 研究開発の方法

(1)人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発に関する研究

- 1) SH-SAWデバイスの伝搬面は、そのままでは細胞接着が難しい。そこで表面改質を行い、安定的な細胞接着性を確保する。細胞接着を確保するため、細胞接着受容体に対するリガンドを持つ化学合成マトリックス(擬似マトリックス)を調製する。
- 2) 生体影響評価用細胞として、2種類の細胞を用意する。一つは、従来から用いてきた不死化肺胞2型上皮(SV40-T2)細胞。もう一つは、HEK293細胞に接着受容体の遺伝子を導入し、細胞-基質間結合を強化した細胞である。
SH-SAWデバイス上で上皮細胞を長期間培養し、上皮組織の形態変化を電子顕微鏡で観察する。

(2)SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究:細胞培養用 SH-SAW デバイスの開発

- 1) SH-SAWデバイスの材料として、LiTaO₃ 結晶に着目、カットの角度を決め、SH-SAW伝搬波が一方方向性に発振するように楕円電極の構造について検討する(IDT-LT)。また、細胞培養に支障を生じないように、絶縁材料を選定する。
- 2) SH-SAW伝搬面上で支障無く細胞が培養できるように、(1)の検討結果を踏まえ、IDT-LTの表面改質を行い、SV40-T2細胞の播種・培養によって、SH-SAW信号がどのように変調するか計測する。
- 3) IDT-LTのSH-SAW伝搬面上にSV40-T2細胞による上皮組織を作成した後、過酸化水素による酸化的刺激を与えて、上皮組織に傷害を与える。その際生ずるSH-SAW信号の変化を計測し、組織傷害の形態とSH-SAWの挿入損出や位相差の変化との関性を解析する。

(3)SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究:SH-SAW デバイス上における上皮組織の構築と組織傷害に伴う信号変調の解析

- 1) 生体影響を評価する細胞には、肺胞上皮組織由来のSV40-T2細胞株を用いる。細胞の機能障害を検出するには、タイトジャンクションの機能低下を調べることができる Transepithelial Electrical Resistance (TER) を計測する方法と、FITC-Dextran粒子の透過性を検出する方法で行う。細胞の形態学的観察には、タイトジャンクションを Zonula occludens (ZO-1)抗体で染色し、アクチン線維をファロイジンで染色して、共焦点レーザー顕微鏡で画像を撮影する。
- 2) SH-SAWの信号計測には、一方方向性浮型電極タイプを用いる。SH-AWの周波数特性は、ネットワークアナライザーを用いて測定する。実験では、SH-SAW伝搬面上にSV40-T2細胞を播種・培養し、細胞層の下面を伝搬する伝搬波の挿入損失と位相変化について測定を行う。

(4)細胞間接着因子E-カドヘリンの発現を強化したヒト細胞培養株の樹立

- 1) HEK293細胞から、ヒトE-カドヘリン遺伝子をクローニングし、コピーミスを修正した後、発現ベクターに移す(pBApoK2-hEcad-MCS)。C末端に、6Hisタグを付けたものも作成する(pBApoK2-hEcad-MCS (6-His))。
- 2) 上記発現ベクターを、HEK293細胞、または、接着受容体を遺伝子導入した 293 recombinant に遺伝子導入し、puromycin で選抜してE-カドヘリン安定発現株を確立する。

(5)SAWバイオナノ協調体用微小流体システムの設計製作に関する研究

- 1) SH-SAWデバイス((2), (3))を、微小流体チップを用いたオンチップ・インキュベーション・システム(OCIS)と統合し、SV40-T2細胞を播種して、OCIS内のSH-SAWデバイス上に肺胞上皮組織を構築する(SH-SAW肺胞上皮協調体OCIS)。これによって、CO₂ インキュベータを必要としない簡易なパネルヒータ上での加温のみで、長期培養が可能か検討する。
- 2) このSH-SAW協調体OCISを用いて、37℃の培養状態から15℃の低温に曝し、2日間の耐性実験を行う。低温処理の前後で SH-SAW信号を計測し、SH-SAW協調体OCIS中の人工肺胞上皮組織の低温耐性を

検証する。

4. 結果及び考察

(1)人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発に関する研究

表面弾性波 (SH-SAW) 伝搬面で細胞培養を実施するために、表面改質を検討した。生物由来の細胞接着蛋白は、コラーゲンやフィブリン等のマトリックス蛋白に吸着固定されることで、細胞に対する接着リガンドを提示するように分子進化して来た。しかし、SH-SAW 伝搬面には本来の結合で安定吸着することが難しい。そこで、a) 伝搬面に細胞接着リガンドを安定して配置できるように、生物由来の細胞接着蛋白に代わって、化学合成(擬似)マトリックスを考案した。b) 擬似マトリックスの側鎖に結合する細胞接着リガンドには、インテグリン接着受容体に対しては、RGD配列を持つFIB-1 ペプチドを用いた(図1)。

影響評価細胞としては、SV40-large T 抗原で不死化したラット肺胞2型上皮 (SV40-T2) 細胞を用いて、SH-SAW チップ上に影響評価上皮組織を形成した (SH-SAW バイオナノ協調体)。

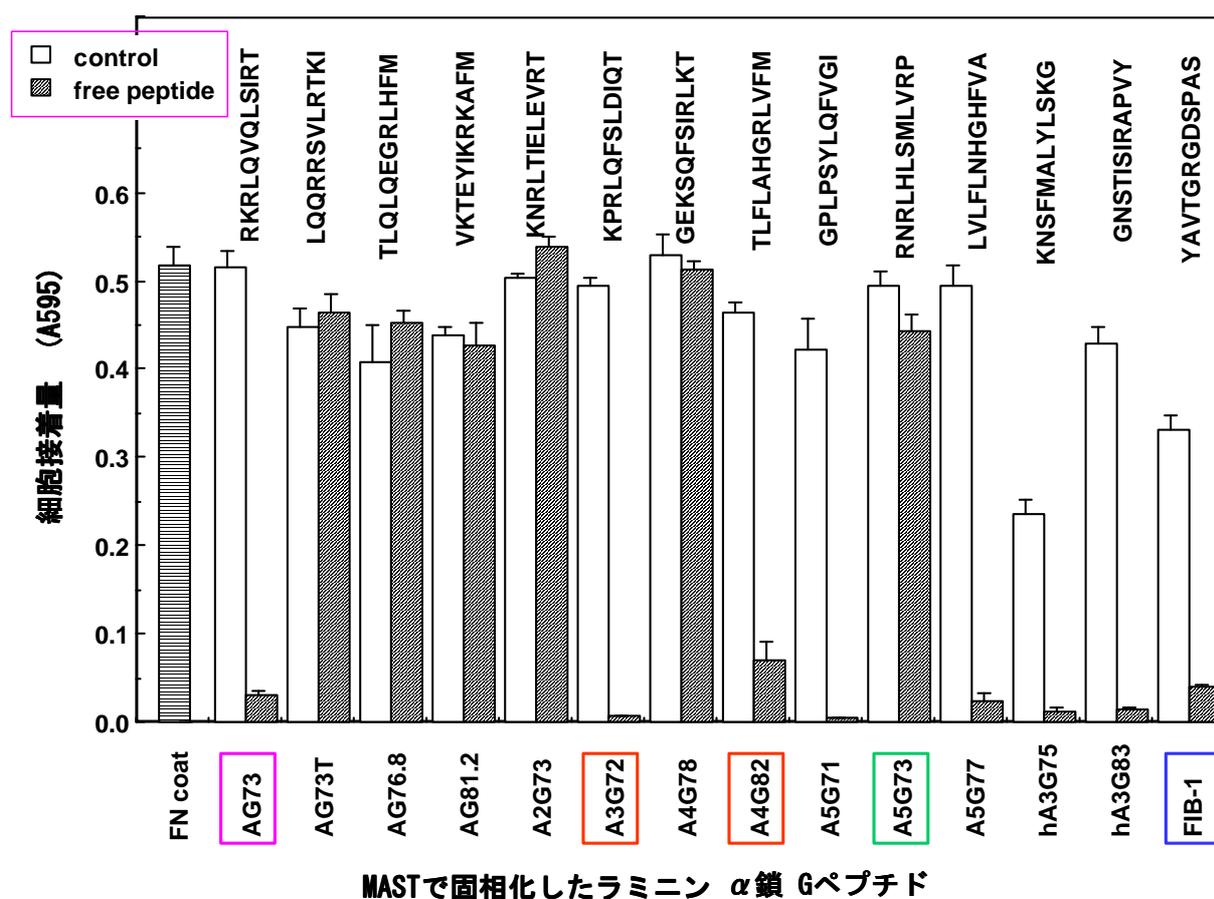


図1. 固相化したラミニン α 鎖 G4 領域ペプチド及びRGDペプチドに対する肺胞上皮細胞の接着及び同一の遊離ペプチドによる接着阻害

SV40-T2細胞は、ラミニンペプチド及びRGDペプチドに対し、無血清の培養条件下でもフィブロネクチン(FN) と同程度の接着性を示した。

(2) SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究:細胞培養用 SH-SAW デバイスの開発

細胞の集合体である生体組織が外部から受ける種々の刺激 (化学的・物理的刺激) に対して生ずる初期反応を、電子素子の特性を活かして直接捕捉することで、複合した環境汚染物質等による生体影響を短時間で評価する方法の開発を目指した。本サブテーマでは、細胞培養液中でも伝搬中のエネルギー減衰が少ない水平せん断型表面弾性波 (SH-SAW: Shear Horizontal Surface Acoustic Wave) に着目し、培養細胞とSH-SAWチップの一体化 (SH-SAWバイオナノ協調体) を図ることで、測定の実時間化を実現した。

(a) バイオセンサとして最適なSAWセンサの基本設計に、開放型浮き電極を採用することで、シングル電極の場合と比べ、ノイズ成分(リップル)の低減化に成功した。

(b) バイオセンサとしてのSH-SAWの計測原理を解析した。SH-SAWの伝搬面上で直接培養する細胞としては、大気汚染物質の代表的標的組織である肺胞上皮由来のラット不死化肺胞2型上皮(SV40-T2)細胞を選択した。図2に、その培養図を示す。

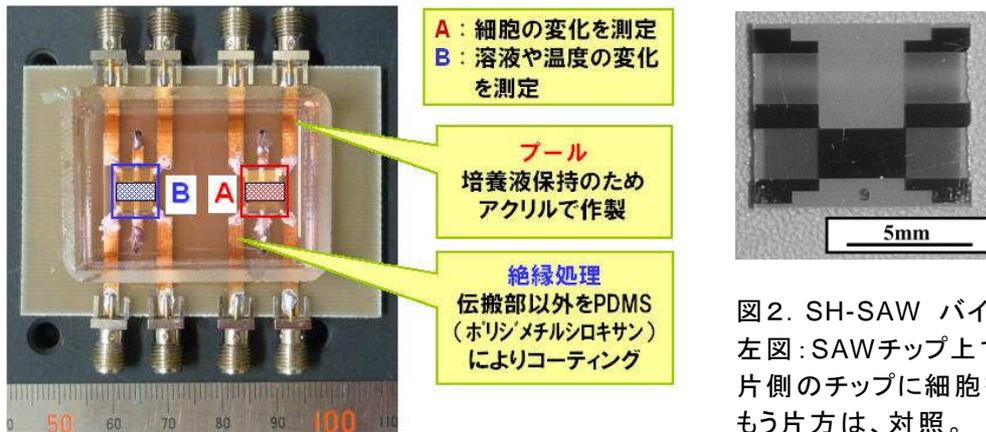


図2. SH-SAW バイオナノ協調体
左図: SAWチップ上での細胞培養装置。
片側のチップに細胞を播種・培養する。
もう片方は、対照。
右図: SAWチップ拡大図。

SH-SAWチップ上にSV40-T2細胞を播種すると、48時間後に細胞は confluent に達した。細胞密度の増大と並行して、SH-SAWバイオナノ協調体からのSAW信号は変調を受け、挿入損出 (Insertion loss)、及び、位相差シフト (Phase shift) は共に増大した (図3)。

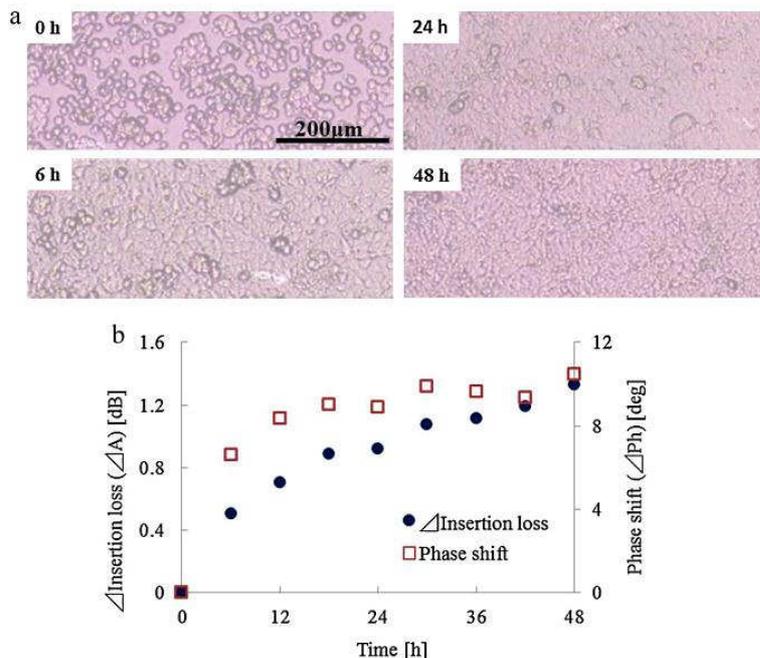


図3. SH-SAW バイオナノ協調体におけるSH-SAW信号の変調
上段(a): SAW チップ上におけるSV40-T2細胞の位相差顕微鏡像。2日後に confluent に達している。下段(b): 挿入損出 (●) 及び位相差シフト (□) は、細胞密度の増加と共に増大した。

(c) 大気汚染物質による酸化ストレスを試験評価するために、過酸化水素をモデル化合物に選択し、培養SV40-T2細胞における密着結合の崩壊が、SH-SAW信号に及ぼす影響を計測した (図4a)。並行して、細胞-細胞間結合の中でも密着結合の状態を示す Transepithelial Electrical Resistance (TER) を計測 (図4b)、並びに、密着結合に局在するZO-1蛋白の局在性を免疫染色により撮影した (図4c)。1mM 過酸化水素の添加によって、TERの低下、及び、ZO-1蛋白の局在性喪失と平行して、主に誘電率を検出するOPEN チャンネルでは、SH-SAWの挿入損失が3時間後から、位相差シフトが添加直後から減衰始め、SV40-T2細胞を播種した時点のレベルまで戻った。他方、主に機械的影響を検出するSHORT チャンネルでは変化がなかった。これらの結果から、過酸化水素による密着結合の崩壊とそれから派生する細胞内変化によって、細胞内及び近傍の誘電率が変化し、OPEN チャンネルのSH-SAW信

号変化に至ったと推測した。

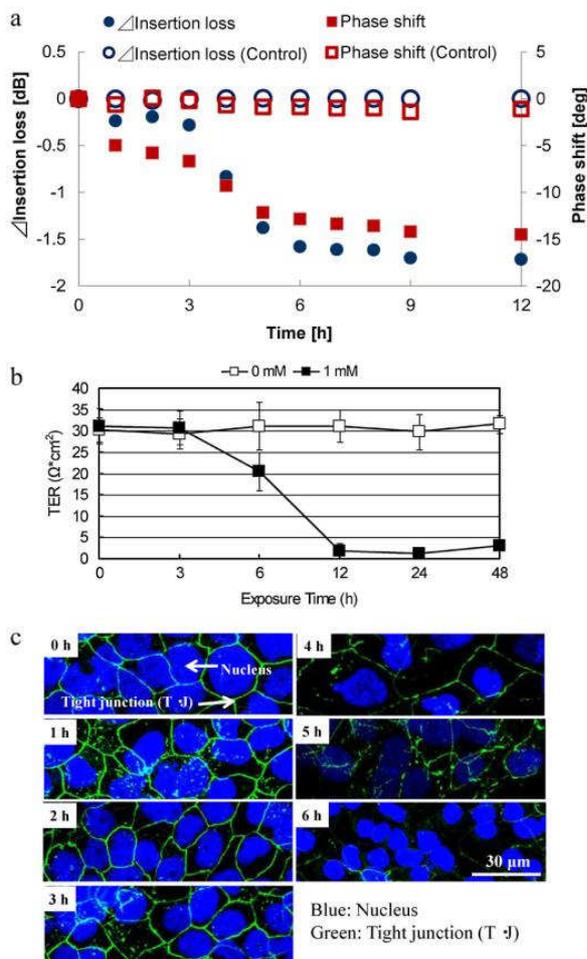


図4. 過酸化水素によるSV40-T2細胞の傷害とSH-SAW信号の変化

上段(a): SH-SAW バイオナノ協調体の信号変化
SH-SAW伝搬面に播種したSV40-T2細胞が増殖に伴って細胞密度が増大し、confluent に近づくに従って増大した挿入損出(●, ○)及び位相差シフト(■, □)(図3を参照)は、1mM 過酸化水素の添加によって減衰し、6時間後にはほぼ培養開始のレベルに戻った(●, ■)。

○, □は、過酸化水素無添加の対照。

中段(b): 過酸化水素による Transepithelial Electrical Resistance (TER) の低下
1mM 過酸化水素の添加6時間目には、SV40-T2細胞のTERは有意に低下した(■)。□は、過酸化水素無添加の対照。

下段(c): 過酸化水素による細胞-細胞間結合の崩壊
密着結合(Tight junction)に局在するZO-1蛋白の免疫染色像。SV40-T2細胞の細胞-細胞間結合は、1mM 過酸化水素の添加によって4時間目以降徐々に壊れ始め、6時間目で崩壊した

(3) SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究: SH-SAW デバイス上における上皮組織の構築と組織傷害に伴う信号変調の解析

環境汚染物質による生体影響を検出評価するために、表面弾性波(SH-SAW)デバイス上に上皮組織を構築した。影響評価には、大気汚染物質の代表的標的組織である肺胞上皮から作製した不死化肺胞2型上皮(SV40-T2)細胞を用いた。デバイス上に播種したSV40-T2細胞が、細胞-基質間及び細胞-細胞間結合を形成し、細胞伸展して上皮組織となるに伴って、SH-SAW伝搬波の挿入損出は増大し、到達時間(伝搬速度/位相差)は短縮(増大/増大)した(図3)。

次に、SH-SAW バイオナノ協調体を用いて、大気汚染物質による生体影響評価のモデル実験を実施した。試験物質には、酸化的ストレスを与える代表的物質として過酸化水素を選択した。培地への1mM 過酸化水素の添加によって、細胞-細胞間結合の一つである密着結合の構成タンパク質 Zonula occludens (ZO-1) の局在性は、添加3~6時間目(以下、遅延相)に掛けて崩壊し、密着結合の機能を示す Transepithelial Electrical Resistance (TER)も激減した(図4a)。また、この変化に先立ち添加1時間~3時間目(以下、初期相)には、細胞基底面に集積するアクチン線維の分解が始まり、更に遅延相では密着結合を裏打ちするアクチン線維も崩壊した(図5B, D)。SV40-T2細胞の傷害と同調するように、SH-SAW伝搬波の挿入損出は、遅延相に入って減衰した(図4a)。他方、SH-SAWの位相差(伝搬速度)は、初期相の時点から二相性に低下した。その結果、SV40-T2細胞は剥離していないにも拘わらず、SH-SAWの伝搬波は細胞播種前の状態に回帰した。

以上の結果から、過酸化水素によるSH-SAWの信号変調は、初期相において細胞内部構造形成に関与するアクチン線維が崩壊して位相差が減少し、次いで遅延相に入って密着結合が崩壊して誘電率が変化し、挿入損失の減衰に至ったと推測した。SH-SAW伝搬波の変調を観察することによって、上皮組織の構造的及び機能的傷害が検出できることが示唆された。

1 μg/ml サイトカラシンDの添加によっても、アクチン線維と密着結合は崩壊し(図5C)、SH-SAW バ

イオナノ協調体における挿入損出、及び、位相差シフトも、同様に減衰した。

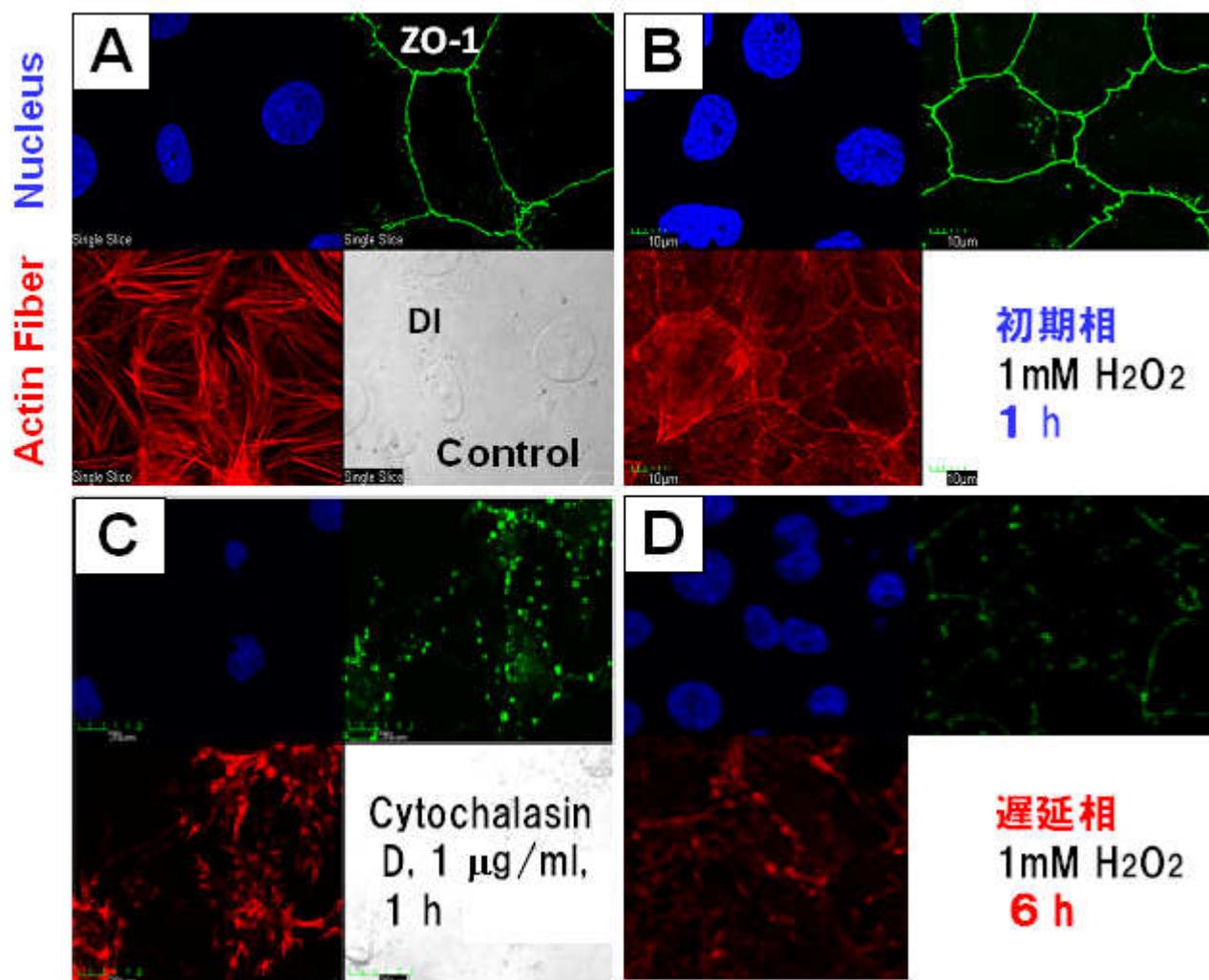


図5. 過酸化水素によるSV40-T2細胞の細胞骨格への傷害

B: 過酸化水素の添加によって、1時間後にはSV40-T2細胞の基底面に沿ってアクチン線維の分解が始まったが、細胞-細胞間結合(ZO-1の局在性)に変化は認められなかった。

D: 6時間後には、アクチン線維、及び、ZO-1の局在性が崩壊した。但し、細胞は剥離していない。

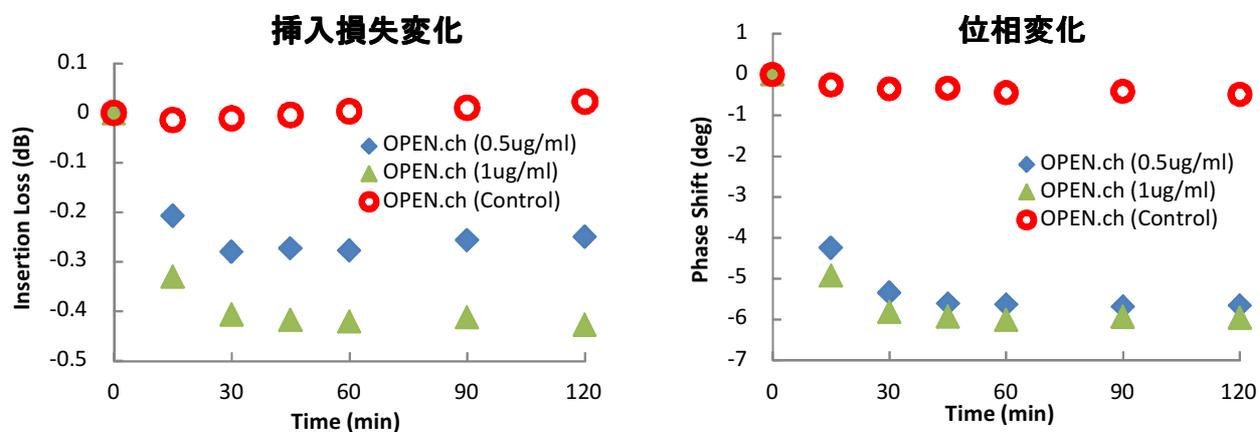


図6. サイトカラシンDによるSH-SAW バイオナノ協調体の信号変化

0.5-1 µg/ml サイトカラシンDの添加によって、SV40-T2細胞の細胞骨格の崩壊と平行して、挿入損出及び位相差シフトは、細胞播種時の状態にまで減衰した。細胞の剥離は無い。

(4) 細胞間接着因子E-カドヘリンの発現を強化したヒト細胞培養株の樹立

ヒトへの健康影響を評価するバイオナノ協調体のセンサ開発に必要とされる、SH-SAWデバイスへの細胞接着性と細胞-細胞間接着性を強化した細胞株の作成を目的として、ヒトE-カドヘリンcDNAを過剰発現する細胞株の樹立を行った。そのため、E-カドヘリンのcDNAを肝臓のcDNAからクローニングし、発現プラスミド、pCMV-hCDH1を構築した。

SH-SAWデバイスに播種する影響評価細胞として、培養基質への接着性を高めるため細胞接着受容体を遺伝子導入した安定発現株が既に用意されており、幾つかの耐性遺伝子が既に細胞選抜に使われている。本サブテーマでは、未選択のピューロマイシン耐性遺伝子有する発現プラスミド(pBApo-CMV Pur)を、安定発現株の選抜に用いた。HEK293細胞を親細胞とするこれらの recombinants は既にE-カドヘリンを発現しているため、導入したE-カドヘリンcDNAと区別できるように、E-カドヘリンのC末端側に6残基のヒスチジンオリゴペプチドを融合したE-カドヘリン発現プラスミドも同時に構築した。

用意した発現プラスミドを、リン酸カルシウム法によってHEK293細胞、及び、recombinants に遺伝子導入し、ピューロマイシンを培地添加して安定発現細胞株を選抜し、細胞株を樹立した。

(5) SAWバイオナノ協調体用微小流体システムの設計製作に関する研究

微小流体システムにおいて、ガス透過性隔壁を介して隣接するジャケットリザーバによるCO₂ガス緩衝作用の下で、細胞培養を可能とするシステム(オンチップ・インキュベーション・システム)を開発した。更に、SH-SAW デバイスによる生体影響評価システム(SH-SAWバイオナノ協調体)とオンチップ・インキュベーション・システムを統合し、その性能評価を行った。その結果、CO₂インキュベータ内での細胞培養を必要とせず、パネルヒータ上での加温のみにて細胞培養を可能にした。この間、外界と隔離され物質移動は無く、滅菌状態は維持された(図7)。

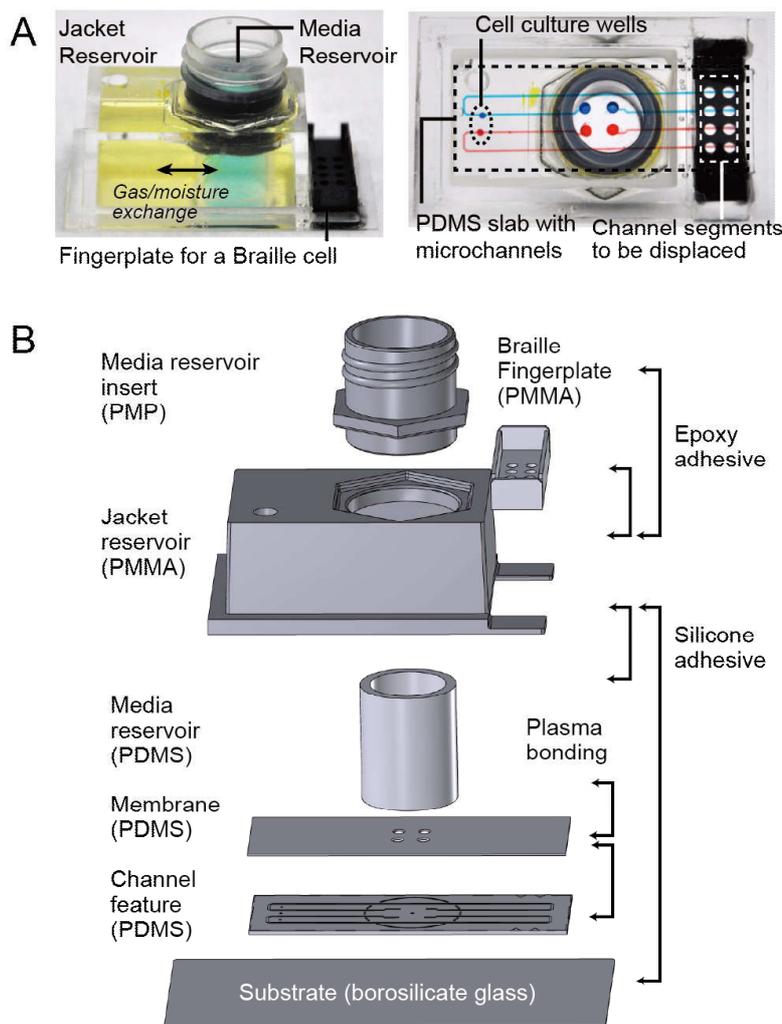


図7. 細胞長期培養のためのオンチップ・インキュベーション・チップ

A: チップ外観図。培地用リザーバが内側に、ジャケット溶液用リザーバが外側に配置されてい

る。それぞれのリザーバは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)製の筒型の壁面で仕切られ、両リザーバ間のガス・水分子の交換を容易としている。リザーバの下面には、2組のマイクロ流路のループを含むPDMS層が配置されている。各流路は入口・出口を有し、それぞれ培地リザーバに連通している。PDMS層の一部はジャケット溶液用リザーバの外側に露出し、点字アクチュエータによるポンプを可能としている。

B: 同チップの分解図。

この統合された SH-SAW バイオナノ協調体オンチップ・インキュベーション・システム(SH-SAWバイオナノ協調体OCIS)で、(2)及び(3)章と同様に過酸化水素による細胞傷害モデル実験を実施し、細胞-細胞間結合の崩壊に起因する SH-SAW の変調信号を検出した(図8)。また、SH-SAW協調体OCIS 内に作成した肺胞上皮組織に対して、低温耐性を試験した。パネルヒータによる加温を停止し、15°Cに48時間曝した後、培地交換をせずに37°Cに戻した。しかし、細胞は全く正常に接着しており、SH-SAW 信号も低温処理以前の状態に速やかに回復した。SH-SAW協調体OCIS 内の肺胞上皮組織は、低温に対しても十分に耐性を持っており、その後のSH-SAW信号計測に支障は生じないことが示された(図9)。

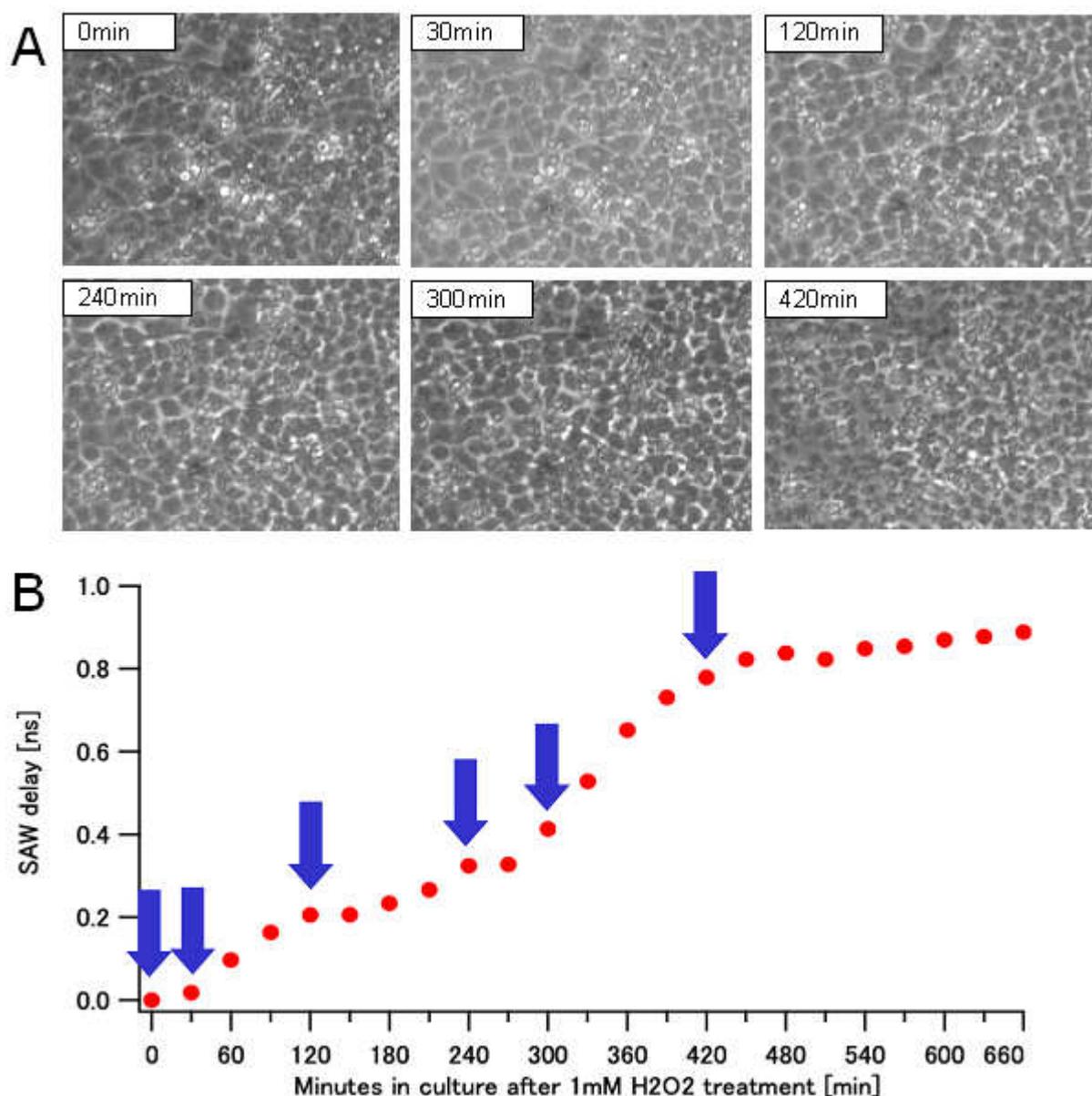


図8. SH-SAW伝搬面で培養維持されたSV40-T2細胞の培地に1mM 過酸化水素(H₂O₂)を添加した後の細胞の位相差像とSH-SAW遅延時間の変化

A: H₂O₂添後の細胞の位相差顕微鏡写真。各パネルに記載の時刻は、H₂O₂添加後の経過時刻を示している。B: H₂O₂添加後のSV40-T2細胞の直下を伝搬したSH-SAWの遅延時間。図中矢印は、

Aの各写真パネルに対応している。

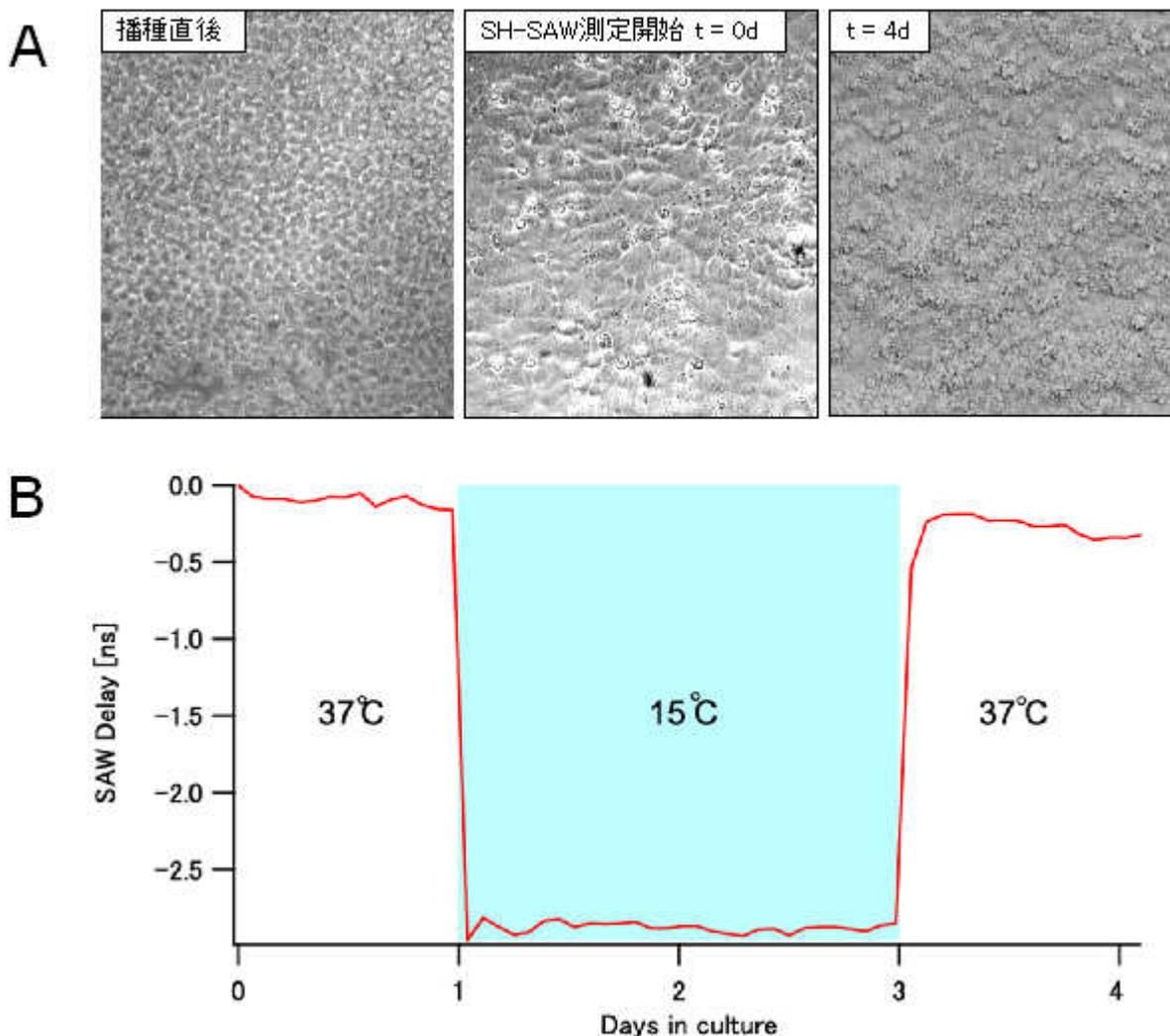


図9. SH-SAWバイオナノ協調体に対する低温耐性

A: 位相差顕微鏡写真。SV40-T2細胞を播種・培養開始後、細胞進展を待って $t=0$ とし、SH-SAWの伝搬時間の計測を開始した。 $t=4d$ は、 37°C 再加温後24時間後を示す。

B: SV40-T2細胞が接着したSH-SAW伝搬面に沿って伝搬したSH-SAWの到達時間。低温処理の期間中は見かけ上変化したが、 37°C に戻すと低温処理前の状態に回復した。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

a) 表面弾性波素子上での細胞培養

従来、培養細胞による *in vitro* 毒性試験は、プラスチック培養皿内で培養された細胞に試験物質を投与し、生化学的、形態学的影響を解析して、試験物質の毒性を評価するのが常套手段である。今回、絶縁処理を施した表面弾性波 (SH-SAW) 素子上での細胞培養が可能になったことで、細胞が被る生体影響を直接 SH-SAW 素子の特性を活かして計測することが可能になった。

本研究で開発したのは、従来の抗体や酵素を用いた抗体型や酵素型バイオセンサの様に、単に特定物質の計測を行うのではなく、環境汚染物質等による生体影響を“細胞や組織に対する機能的・構造的変化”として計測する、新規概念に基づくバイオセンサである。

b) 電子素子の表面改質

電子素子上で細胞培養を可能にする手段が提示された。培養細胞を電子素子表面に細胞接着させるためのインターフェースとなる化学合成 (擬似) マトリックスの開発である。擬似マトリックスが素子表面に安定して吸着することにより、擬似マトリックスの接着リガンドが細胞に提示出来る様になった。尚、この表面

改質によって、SH-SAWの伝搬波特性に影響は無かった。

c) SH-SAWバイオナノ協調体

SH-SAWの信号変化と細胞の形態学的変化との関係性を明らかにした。即ち、SH-SAWデバイス上に上皮組織を形成することで、伝搬波の挿入損出や位相差(速度)は増大する。しかし、過酸化水素やサイトカラシンDによるアクチン線維の分解による細胞内部の物性変化と、それに続くタイトジャンクションの崩壊によって、伝搬波の位相差や挿入損出が減衰し、細胞播種以前に回帰することを、信号変調成分の詳細な解析によって明らかにした。この時、細胞がSH-SAW伝搬面から剥離すること無く、SH-SAW信号が変調した。従来の生化学的指標の変化に基づいて生体影響を評価する方法とは異なり、上皮組織としての生理的影響として評価するのに役立つと考えられる。

d) オンチップ・インキュベーション

SH-SAW肺胞上皮協調体(c)の周辺装置をコンパクトにパッケージ化する為に、協調体をオンチップ・インキュベーション・システム(OCIS)に統合した(SH-SAW肺胞上皮協調体OCIS)。この結果、簡易なパネルヒータ上での加温のみで、SH-SAWデバイス上に構築した肺胞上皮組織は、過酸化水素による酸化的刺激によって、通常の協調体(c)と同様に組織傷害を受け、信号変調を呈した。また、微小流路内のSH-SAWデバイス上に播種された上皮細胞は、長期間安定して生存し、低温にも耐性を示した。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

- a) 特定物資をモニターするのではなく、細胞や組織に対する“機能的・構造的変化を計測できる”バイオナノ協調体を用いることで、膨大な数の環境化学物質について、相互に比較しながら毒性試験が可能になる。統一された仕様での試験であることから、毒性試験結果を広汎にランク付けし、監視対象の絞り込みと重点化に貢献できる。
- b) 環境の複合汚染による生体影響を軽微な段階で留めるためには、環境モニタリングによる汚染初期段階での把握と防止が肝要である。今回新たに開発したSH-SAW肺胞上皮協調体による汚染物質の計測原理によれば、刺激を受けた肺胞上皮細胞内部で引き起こされる軽微な(細胞死に至る遥か以前の)物性変化、及び、外界から異物侵入を防ぐことが困難になるタイトジャンクションの崩壊が、SH-SAWの変調信号の検出によって、未知或いは複合的存在であっても健康影響物質として検知することが可能であり、環境モニタリングの構築に貢献できる。
- c) SH-SAWバイオナノ協調体を、オンチップ・インキュベーション・システムと統合する(SH-SAWバイオナノ協調体OCIS)ことで、基本的な訓練を受けるだけで簡便かつ確実に、環境中の健康影響物質の存在を検知することが可能である。この特性を活かして、特定物質をモニタリングするのではなく、生体影響としてモニタリングすることに貢献できる。
- d) SH-SAWデバイスに限らず、バイオナノ協調体OCISの製造・搬送・計測に関わる分野で、新規産業化が見込める。現在、東アジアや東南アジアで進行している経済発展に伴う環境汚染を極力低減し、日本への越境汚染も防止するには、環境管理技術の一環として、環境汚染物質のモニタリングだけでなく、健康影響を計測する技術も欠かせない。本研究で開発した“誰にでも簡単に扱えて、健康影響があるかどうか計測できるバイオナノ協調体OCISは、この様な要請にも応えられる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) 二井信行, 高野温, 宮下三佳, 田中真人: 生体医工学, 47, 6, 529-534 (2009) 「ポリジメチルシロキサ

ン隔膜を介した水分・ガス交換による微小流体細胞培養デバイスのオンチップCO₂インキュベーション」

- 2) T. KAWAUCHIYA, R. TAKAHASHI, Y. KUDO, A. TAKAMORI, T. SASAGAWA, K. TAKAHASHI and H. KIKUCHI: *Toxicology Letters*: 205, 196-202 (2011)
“Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells.”
- 3) 村原中, 脇田晃充, 三宅裕, 立石昇一朗, 平山貴浩, アズラン・アズヒム, 村松和明, 田中真人, 遠藤修, 宮崎幸造, 松尾洋孝, 四ノ宮成祥, 守本祐司(2011)「脱細胞化血管スキャフォールドを用いた細胞培養用リングモジュールの開発」*生体医工学*, **49** 巻 3 号 508-515 (2011)
- 4) A. TAKANO, M. TANAKA and N. FUTAI: *Microfluid. Nanofluid.*, 12, 6, 907-915 (2012)
“On-chip CO₂ incubation for pocket-sized microfluidic cell culture.”
- 5) S. KASAI, T. ISHIGAKI, R. TAKUMI, T. KAMIMURA, H. KIKICHI, *Biochim. Biophys. Acta, General Subjects*, 1830, 2509-2516 (2013) “Beta-catenin signaling induces *CYP1A1* expression by disrupting adherens junctions in Caco-2 human colon carcinoma cells.”
- 6) H. OTORI, T. HIGASHIYAMA, A. UEHARA, M. KAINUMA, Y. KUDO, T. KAMIMURA, T. KON, K. MOCHITATE, H. KIKUCHI, Y. FURUYA, *Sensors and Actuators: A, Physical*
“Signal Change of Surface Acoustic Wave (SAW) Caused by H₂O₂ Damage to SV40-T2 Cells Cultivated on SH-SAW Sensor.” (in press)

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 高野温, 宮下三佳, 田中真人, 二井信行: 生体医工学シンポジウム2009, 千葉 (2009)
「ポリジメチルシロキサン隔膜を介した水分・ガス交換による微小流体細胞培養デバイスのオンチップCO₂インキュベーション」
- 2) 上原 篤詞, 貝沼 美帆, 古屋 泰文, 成田 絵里子, 今 大健, 持立 克身: 第4回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム講演要旨集, 27pp. (2010)
「培養細胞の表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子ナノ・バイオセンサ」
- 3) 上原篤詞, 貝沼美帆, 古屋泰文, 成田絵里子, 今大健, 持立克身: 日本金属学会講演概要, 2010 年秋季(第 147 回)大会, p. 170 (2010),
「培養細胞による表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子バイオセンサ」
- 4) 川内谷知子, 高森章子, 内匠涼, 高橋平衡, 菊池英明: 第33回日本分子生物学会年会(2010)「カビ毒パツリンによる大腸癌細胞株Caco-2のタイトジャンクション崩壊機構」
- 5) 高野温, 田中真人, 二井信行: 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会(22nd CHEMINAS), 名古屋 (2010)
「微小流体チップの完全閉空間オンチップインキュベーションの評価」
- 6) A. TAKANO, M. MYASHITA, M. TANAKA and N. FUTAI: 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2010), Hong Kong, (2010)
“Microfluidic cell culture with simplified on-chip CO₂ incubation.”
- 7) 上原篤詞, 古屋泰文, 貝沼美帆, 今大健, 持立克身:
第 20 回インテリジェント材料/システムシンポジウム講演要旨集, pp. 10, (2011)
「培養細胞の表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子バイオセンサ」
- 8) 滝澤 和也, 高野 温, 今 大健, 上原 篤詞, 貝沼 美帆, 古屋 泰文, 持立 克身, 田中 真人, 二井 信行: 生体医工学シンポジウム2011(2011)
「表面弾性波素子の微小流体細胞培養チップへのパッケージング」
- 9) A. TAKANO, T. OGAWA, M. TANAKA and N. FUTAI: 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '11), Boston, MA, USA (2011)
“On-chip Incubation System for Long-term Microfluidic Cell Culture.”
- 10) 高野温, 田中真人, 二井信行: 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2011, 東京 (2011)
「マイクロ流体下での長期細胞培養のためのオンチップCO₂インキュベーション」
- 11) M. KOTAKA, Z. QIN, N. SHIRAKI, K. UMEDA, K. KUME, S. KUME, and K. MOCHITATE.
Functional hepatic tissue reconstruction with primary hepatocytes on synthesized basement membrane substratum and its application to ES cell differentiation to hepatocytes. KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine, Global COE and IMEG. Sep 8–9,

2011.

- 12) 持立克身, 桑昭苑, 曾勤, 小高真希, 白木伸明, 樋口裕一郎, 永野麗子: 日本結合組織学会・マトリックス研究会合同シンポジウム2“再生医療・臓器再生・人工臓器とマトリックス工学”(2011)「基底膜構造体を培養基質に用いた幹細胞の分化と機能発現」
- 13) 大鳥秀貴, 上原篤詞, 貝沼美帆, 工藤優佳子, 東山拓海, 今大健, 持立克身, 菊池英明, 古屋泰文: 第21回インテリジェント材料システムシンポジウム(2012)
「表面弾性波(SH-SAW)基板に培養した細胞の損傷による信号変化」
- 14) 東山拓海, 大鳥秀貴, 貝沼美帆, 工藤優佳子, 持立克身, 菊池英明, 古屋泰文:
日本機械学会東北学生会第42回卒業研究発表講演会(2012)
「SAW デバイス基板上の SV40-T2 培養細胞の薬液(過酸化水素)損傷に伴う SH-SAW 信号変化」
- 15) H. Otori, A. Uehara, M. Kainuma, Y. Kudo, T. Higashiyama, T. Kon, K. Mochitate, H. Kikuchi, Y. Furuya: The International Workshop on Piezoelectric Materials and Applications (IWPCA) 2012 (2012) “Signal Change of Surface Acoustic Wave (SAW) by H₂O₂ Damage to SV40-T2 Cells Cultivated on SH-SAW Sensor”
- 16) A. TAKANO, K. TAKIZAWA, T. KON, M. TANAKA, Y. FURUYA, N. FUTAI: 1st Progress and Innovation of Smart Materials and Related Technology (PI-SMART2012), Hirosaki, Aomori, 2012
“SAW chip-equipped microfluidic platform for cell-based biosensing.”
- 17) 二井信行: PI-SMART in 仙台(2012)
「SH-SAW+マイクロ流路の結合型バイオセンサ」
- 18) 柴田昌宏, 相澤典男, 高野温, 大鳥秀貴, 今大健, 古屋泰文, 持立克身, 田中真人, 福井康裕, 二井信行: 生体医工学シンポジウム2012 (2012)
「培養細胞単層の粘弾性測定の横波表面弾性波による計測」
- 19) 相澤典男, 柴田昌宏, 高野温, 福井康裕, 田中真人, 二井信行: 生体医工学シンポジウム2012 (2012)
「マイクロ流体チップへの細胞播種自動化プロセス」
- 20) N. FUTAI: 5th International Conference on Biosensors, Biochips, and Bioelectronic Devices (BIOTRONICS2012), Gwangju, Korea, 2012
“All-in-one Pocket-sized Long-term Cell Culture System Using Braille-based Microfluidics and On-Chip CO₂ Incubation.”
- 21) 高野温, 柴田昌宏, 大鳥秀貴, 今大健, 古屋泰文, 持立克身, 福井康裕, 田中真人, 二井信行: 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2012 (2012)
「オンチップCO₂インキュベーション下で培養した細胞の表面弾性波による挙動解析」
- 22) A. TAKANO, S. INOMATA, T. OGAWA, N. FUTAI, M. TANAKA: American Society for Cell Biology (ASCB) 2012 Annual Meeting, San Francisco, CA, USA (2012)
“Applications of the microfluidic cell culture system with on-chip CO₂ incubation for cell biology.”
- 23) 東山 拓海, 大鳥 秀貴, 工藤優佳子, 磯野 晶宏, 今 大健, 持立 克身, 菊池 英明, 古屋 泰文: 第 22 回インテリジェント材料/システムシンポジウム (2013)
「SH-SAW 電極間に培養した SV40-T2 細胞の薬液損傷モニタリング」
- 24) A. TAKANO, M. TANAKA, N. FUTAI: 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka, Japan (2013) (accepted)
“Microfluidic cell culture system with on-chip hypoxic conditioning.”

7. 研究者略歴

課題代表者: 持立 克身

独立行政法人国立環境研究所環境健康研究センター、フェロー

(1): 持立 克身 (同上)

(2): 古屋 泰文

弘前大学大学院理工学研究科 教授

(3): 菊池 英明

弘前大学農学生命科学部 教授

(4): 田中 真人

東京電機大学理工学部 教授

(5): 二井 信行

東京電機大学総合研究所 助教

C-0803 人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発に関する研究

(1) 人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発に関する研究

(独) 国立環境研究所 環境健康研究センター 持立 克身・中村 宣篤・曾 勤
大竈 敬子・佐藤 薫
環境計測研究センター 中村 みなみ

平成21～24年度累計予算額：39,235千円（うち、平成24年度：6,830千円）

予算額は、間接経費を含む。

平成20年度はナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

[要旨]

表面弾性波（SH-SAW）伝搬面で細胞培養を実施するために、表面改質を検討した。生物由来の細胞接着蛋白は、コラーゲンやフィブリン等のマトリックス蛋白に吸着固定されることで、細胞に対する接着リガンドを提示するように分子進化して来た。しかし、SH-SAW 伝搬面はコラーゲンやフィブリンとは異なるので、本来備わった性質で安定吸着することが難しい。そこで、a) 生物由来の細胞接着蛋白に代わって、化学合成（擬似）マトリックスを考案した。擬似マトリックスは、複数個の疎水性側鎖Rと基質との疎水結合によって、基質への安定した吸着を可能とする。b) 擬似マトリックスの側鎖に結合する細胞接着リガンドには、インテグリン接着受容体に対しては、RGD配列を持つFIB-1 ペプチドを用いた。シンデカン（syndecan）接着受容体に対しては、ラミニンペプチドを用いた。

影響評価細胞としては、SV40-large T 抗原で不死化したラット肺胞2型上皮（SV40-T2）細胞を用いて、SH-SAW チップ上に標的上皮組織を形成した（SH-SAW バイオナノ協調体）。更に、ヒトES細胞から分化誘導することで、影響評価細胞を得ることが出来ないか検討した。Feeder 細胞の混入による信号への摂動が懸念されることから、自主開発した基底膜構造体形成技術を用いてヒトラミニン-511 の基底膜基質を作製し、feeder 細胞は用いない分化培養方法について検討した。環境汚染物質に対する感受性が高い組織の一つである神経や血管内皮への分化誘導を検討した。

SH-SAW 信号が、伝搬面上に形成した上皮組織によってどのような機構で変調を受けるか解析するため、東京電機大学と共同で、細胞-基質間結合や細胞-細胞間結合を変えた、種々の HEK293 recombinants を試作して、バイオナノ協調体の作製に供した。

[キーワード]

疎水化、擬似マトリックス、SV40-T2 細胞、細胞接着、基底膜基質

1. はじめに

環境中には多くの化学物質が存在し、また、多くの化学物質が新たに製造・使用されようとしていることから、化学物質の安全性、あるいは、医薬品等の副作用を迅速に評価することは最重要課題のひとつである。代表的な化学物質の影響評価手法には、曝露を受けた組織や細胞を採取・破碎し、その後、標的成分を抽出・分離・分析する方法がある。しかしこれには、結果を得るまでに労力と時間が掛かり、侵襲的であり、暴露装置や分析装置等、多種類の大きがかりで高額な周辺装置が必要となる。他方、バイオアッセイ法には、化学発光法を用いて特定遺伝子の発現や代謝全般への影響で評価する方法、あるいはミジンコ等の微生物の行動観察、微生物の発光酵素の減衰から毒性を評価する方法等が開発され、前者に比べればいずれも安価で成果を上げているが、影響評価が限定的である欠点はぬぐえない。現時点では、より高い確度をもって判定するには、動物実験に頼らざるを得ない。動物実験は高い信頼性を持つ一方で、有意な結論を得るには、個体差や定量性に十分に留意する必要がある。最近では、倫理面から動物実験はできるだけ少なくしようとする動きが、国際的には加速されつつある。このような社会情勢と測定技術が抱える問題点を考慮し、平成15-19年度に「バイオナノ協調体による有害化学物質の生体影響の高感度・迅速評価技術の開発」プロジェクトが開始された。

2. 研究開発目的

“バイオナノ協調体”とは、新規素材上に自在に人工組織を形成するバイオテクノロジーと、ナノテクノロジーを活用したセンサー技術を融合させた、従来の範疇には属さない新規バイオセンサーで、人工組織から発信されるシグナルを直下のセンサー媒体が直接感応できるように、インターフェースの役割を担う化学合成（擬似）マトリックスによって両者が一体化した“人工組織－ナノデバイスセンサー複合体”である。

我々の体は、多く種類の臓器から構成されている。それぞれの臓器は、外界に接している上皮組織、循環器系の一員である血管内皮組織、及び両者間を充当する形で存在する間充織等から構成されている。外界に接している上皮組織は、有害化学物質や微生物等の異物の侵入に常に曝されている。他方、血管内皮組織は、侵入した異物が体内に拡散する過程で集積する組織であり、上皮組織とは違った形で異物の影響に曝されている。上皮組織としての最小単位は上皮細胞と基盤となる基底膜構造体から、血管内皮組織としての最小単位は血管内皮細胞と基盤となる基底膜構造体から構成されており、さらにその下部には線維芽細胞や平滑筋細胞等から成る間充織が存在する。

本研究では、上皮組織や血管内皮組織と同等の機能を有し、外部刺激に対する細胞応答信号を発信できる人工組織を、機能協調を可能にする擬似マトリックスを介して、非侵襲的に、連続して、高感度に検出できるナノ構造体上に構築した”バイオナノ協調体”を創製する。このバイオナノ協調体を用いて、動物実験系を一部代替し、既存・新規化学物質の安全性評価、並びに医薬品としての副作用を、迅速・高効率に実現する手法の確立をめざす。

3. 研究開発方法

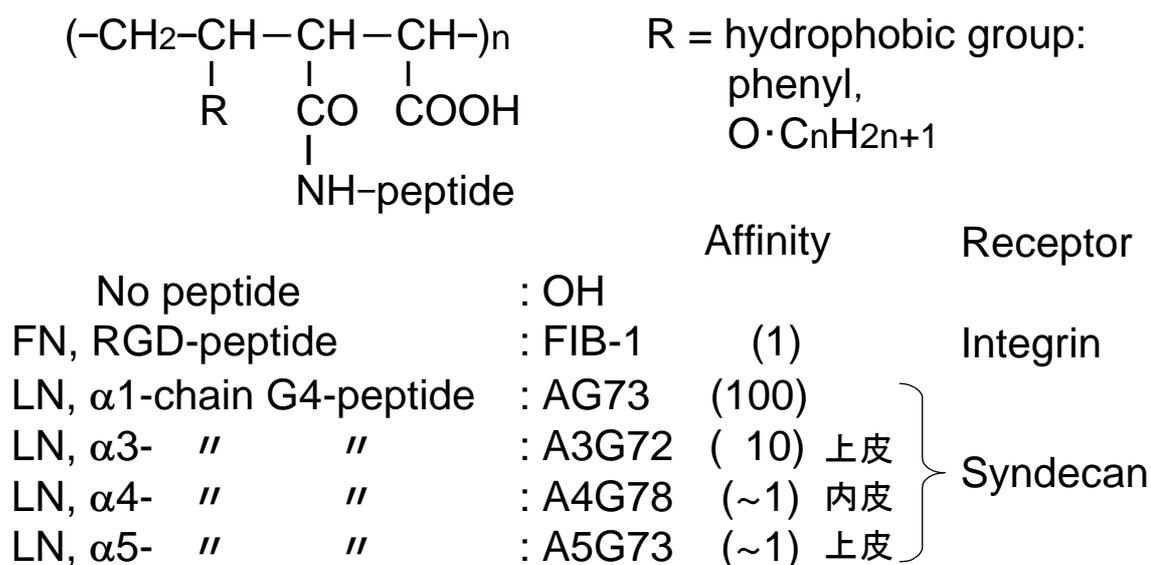
(1) SAWチップ上での細胞培養に関わる幾つかの課題

1) SH-SAW 伝搬面の改質

a) 化学合成（擬似）マトリックスコートによる細胞接着性の確保

センサーとして用いる電子デバイス表面は、生体組織とは異なるので、常套手段である生物由来の細胞外マトリックス（コラーゲンやフィブロネクチン等）を用いても、細胞外マトリックスのコートが不安定で、その結果細胞の接着は安定しない。そこで、ポリエチレンポリマーを主鎖とし、側鎖に疎水性基（R = phenyl, OC_nH_{2n+1}）と無水マレイン酸を持つ、化学合成（擬似）マトリックスを合成した。疎水性基Rは、それぞれの電子デバイスに適した疎水性基を選択することで、電子デバイスと安定な疎水結合を形成でき、無水マレイン酸は、種々の細胞接着リガンドである合成ペプチドと共有結合できる。この擬似マトリックスをインターフェースに用いることで、細胞は電子デバイス上で安定した細胞接着が可能になる。図(1)-1 に、擬似マトリックスの構造を示した（特許No.4555773, US Patent No. 8304238）。

擬似マトリックスによる細胞接着性の試験には、SV40-large T 抗原で不死化したラット肺胞2型上皮（SV40-T2）細胞を用いた。先ず、SV40-T2 細胞を、FBSを含まないDMEM培地に 6.0×10^5 cells/ml の濃度に懸濁し、擬似マトリックスをコートした96穴培養皿に、各々100 μ l播種した。1日間CO₂ インキュベータ内で培養した後、メタノール100 μ lで固定し、0.4%クリスタルバイオレット50 μ lで染色、595nmの吸光度を測定した。



図(1)-1. 化学合成（擬似）マトリックスの構造

b) 擬似マトリックスコートの最適化

従来は、擬似マトリックス（図(1)-1）の側鎖の種類を変えて、LiTaO_x に対する親和性を検討した。

2) SAWチップ上での長期細胞培養時に於ける細胞形態の検討

擬似マトリックスをコートした SH-SAW 伝搬面上に於ける上皮細胞の形態は、長期培養によってどの様に変化するか、位相差顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて観察した。電子顕微鏡による観察に際しては、SAWチップ上で培養した細胞を定法に従って2.5%グルタルアルデヒドで固定し、走査型電子顕微鏡 (SEM) 及び透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察のために、試料をプロセスした。

(2) 多角的毒性検査に適した影響評価細胞の種類を拡充する方法

バイオナノ協調体に用いる影響評価細胞は、幾つかの要件を満たす必要がある。

- ① センサーの特性に合致する。
- ② 正常細胞である。癌細胞由来ではない。
- ③ 遺伝的形質が安定している。

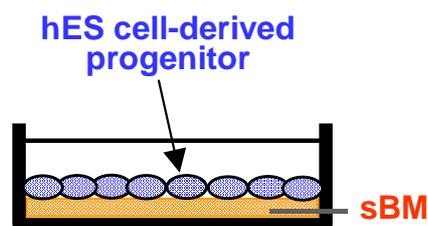
センサーの特質に依存して、計測される細胞や組織の状態に対する認識は変わって来る。今回用いたSH-SAW センサーに於いては、センサー表面を伝搬する表面弾性波が、播種した細胞の基底面を含む近傍の誘電率及び粘弾性の状態を反映して変調を受ける。この特性を計測結果に感度良く反映させるには、播種した細胞が SH-SAW 伝搬面に、極近距離で強く接着している必要がある。この目的を達成するため擬似マトリックスには、インテグリン接着受容体に呼応したRGD配列ペプチド、及び、シンデカン接着受容体に呼応したラミニン α 鎖G4領域接着ペプチドを用意した (図(1)-1)。もう一方で、シンデカン接着受容体を介した細胞接着の安定を図るため、HEK293 細胞に上皮細胞のシンデカン遺伝子を強制発現させた rSN 細胞を作製した。更に東京電機大学と共同で、細胞-細胞間結合形成に必須なE-カドヘリンも同時に強制発現させた rSN/Ecad 細胞を作製し、これらの細胞を弘前大学の共同研究者に提供した。

(3) ヒトES細胞から影響評価細胞を調製する方法

これまで大気汚染物質の毒性評価に用いて来たラット肺胞2型上皮 (SV40-T2) 細胞や(2)で作製した細胞は、適度の増殖性能を持ち、調製が比較的簡単であり、SH-SAW バイオナノ協調体の測定原理を解析するには好都合である。しかし、生体影響評価に用いる細胞としては、別の観点から新たな細胞を準備しておく必要がある。SV40-T2 細胞、或いは、HEK293 系列の細胞は癌細胞ではなく、意図的に不死化した細胞ではあるが、正常組織から採取した初代培養細胞の方が、生体影響評価という観点からはより適切であろう。但し、初代細胞の調製は煩雑であり、継代数も限られる。特にヒトの細胞を用いる場合は、ロット毎に遺伝的形質が変動する不確定性もある。これらの点を勘案し、ヒトES細胞を分化誘導することで、目的の成熟した標的細胞を得ることが出来るか検討した。

これまでは、種々の feeder 細胞との共培養で hES 細胞から分化誘導するのが常套手段であったが、feeder 細胞の混入により毒性評価の閾値が変動する可能性もあるので、feeder 細胞を用いない分化誘導を検討する必要がある。そこで、rLN-10 細胞から作製したヒトラミニン-511 の基底膜基質 (hLN10-sBM) を用い、feeder 細胞は用いない分化培養方法について検討した (図(1)-2)。この培養基質を用いることで、マウス/ヒトES細胞から臍島 β 細胞や肝実質細胞へ分化誘導できることが、既に熊本大学・発生医学研究所との共同研究で確立

している¹⁻³⁾。本研究では、環境汚染物質に対して感受性が高い組織の一つである神経や血管内皮を選択し、hES細胞からの分化誘導について検討した。



図(1)-2. 基底膜基質上でのhES細胞由来前駆細胞の培養

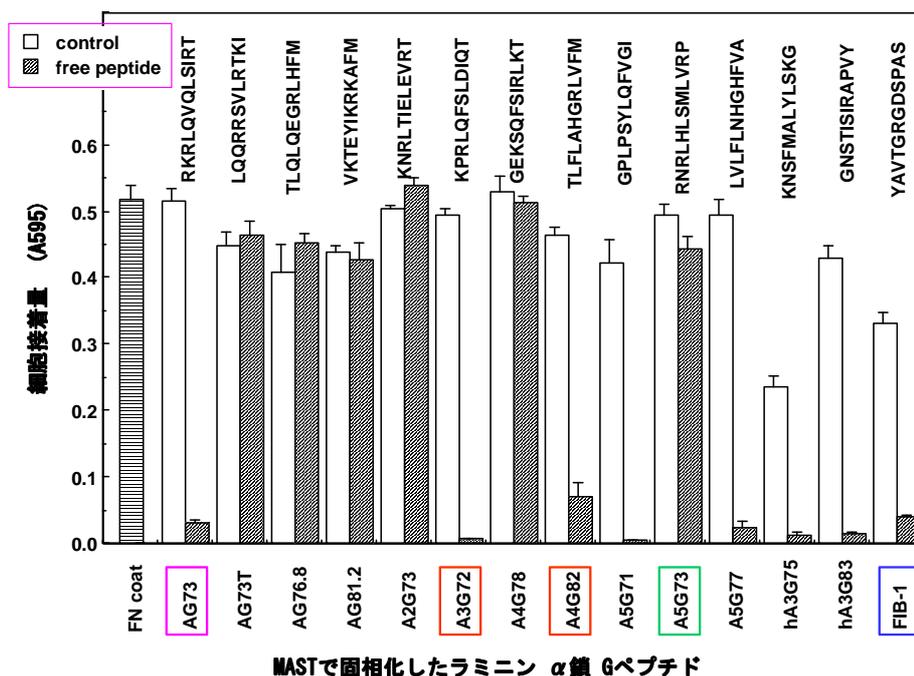
具体的には、hES細胞から神経や血管内皮細胞にまで分化誘導させ、そこから目的の細胞を単離するのは、多大な労力と時間が掛かるので効率が悪い。そこで、市販されているhES H9株由来神経前駆細胞や血管内皮前駆細胞（メルクミリポア，SCR055及びSCR221）を購入し、これらの前駆細胞からhLN10-sBM基質上で成熟誘導させる方法を検討した。

4. 結果及び考察

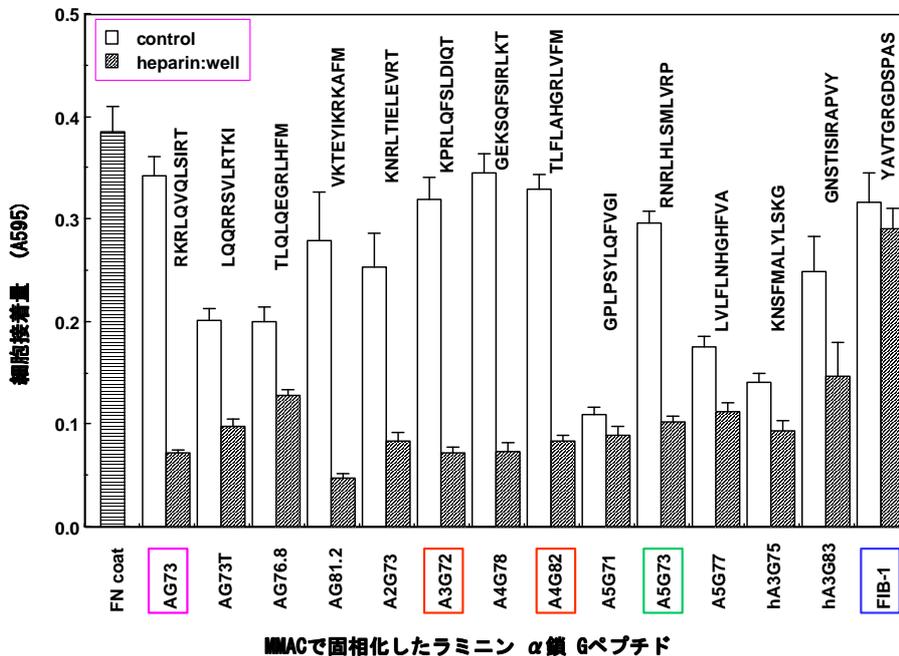
(1) SAWチップ上での細胞培養

1) SH-SAW 伝搬面の改質：化学合成（擬似）マトリックスコートによる細胞接着

マウス・ラミニンの α 鎖G4領域に存在する細胞接着領域は、細胞表面のシンデカン接着受容体に結合し、受容体の一部であるヘパラン硫酸と類似の構造を持つヘパリンによって、結合阻害をうける。このことを利用し、 α 1鎖から α 5鎖までの全ての α 鎖（ α 1- α 5鎖）G4領域の代表的な接着ペプチドを合成し、MASTまたはMMA Cポリマー（R=phenyl, OCH₃）と反応させ、その細胞接着性能を、ラット不死化肺胞2型上皮（SV40-T2）細胞を用いて検討した。培養溶液には、遊離の接着ペプチドを共存させるか（図(1)-3）、もしくは固相化した接着ペプチドに1mg/mlヘパリン処理を行い（図(1)-4）、結合阻害の有無も検討した。



図(1)-3. 固相化したラミニンα鎖G4領域ペプチド及びRGDペプチドに対する肺胞上皮細胞の接着及び同一の遊離ペプチドによる接着阻害



図(1)-4. 固相化したラミニンα鎖G4領域ペプチド及びRGDペプチドに対するヘパリン処理による肺胞上皮細胞の接着阻害

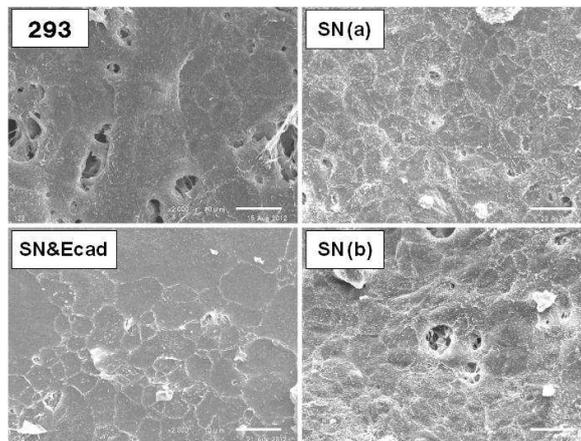
対照には、フィブロネクチン (FN) をコートした。何れのペプチドも FN と同程度の細胞接着能を示したが、AG73 で囲んだペプチドは、遊離ペプチドやヘパリンによる接着阻害が明確

に認められ、これらのペプチドをSH-SAW伝搬面に対する細胞接着の為のリガンドに用いることにした。インテグリン接着受容体に対する RGD ペプチドとして、FIB-1 も併せて検討した。

2) SAWチップ上での長期細胞培養に於ける細胞形態

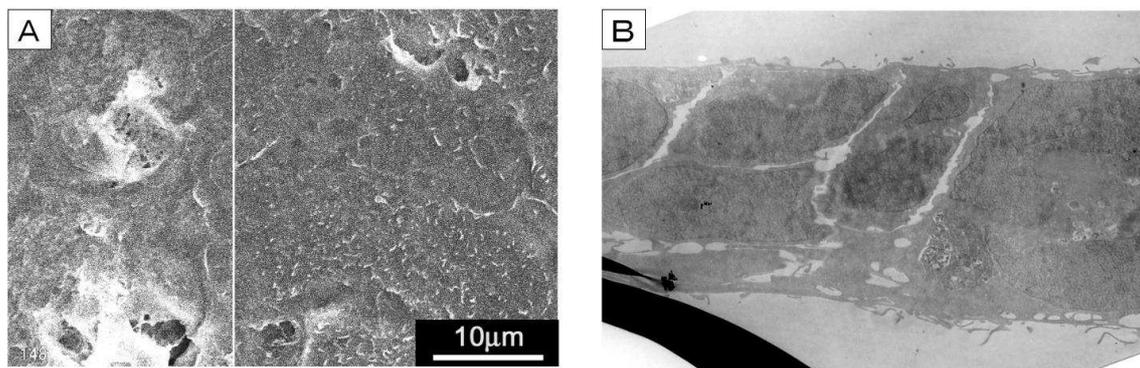
表面改質したLiTaOxのSAWチップ上に、SN&Ecad細胞を播種し、約1週間培養した。培養後、定法により細胞を2.5%グルタルアルデヒドで固定、走査型電子顕微鏡で細胞-細胞間結合を観察した(図(1)-5)。

SN&Ecad細胞は、正常に密着結合を形成しているのが観察された。また、syndecan-2遺伝子のみ遺伝子導入したSN細胞も、上面に起伏があるが、ほぼ正常な密着結合を形成していた。しかし、親株の293細胞は、細胞-細胞間結合が不完全で、細胞同士が重層している個所や、内部に通ずる空洞も観察された。



図(1)-5. LiTaOx SAW チップ上に播種した上皮細胞の密着結合。培養期間は約1週間。Bar : 10 μ m。

SN&Ecad細胞を2週間培養すると、細胞-細胞間結合の個所に、内部に通じる空洞が僅かだが出現するようになった(図(1)-6A)。また、透過型電子顕微鏡による観察では、プラスチック培養皿での培養と同様、細胞が重層もしくは擬重層を呈した。親細胞の293細胞由来だと推測される(図(1)-6B)。

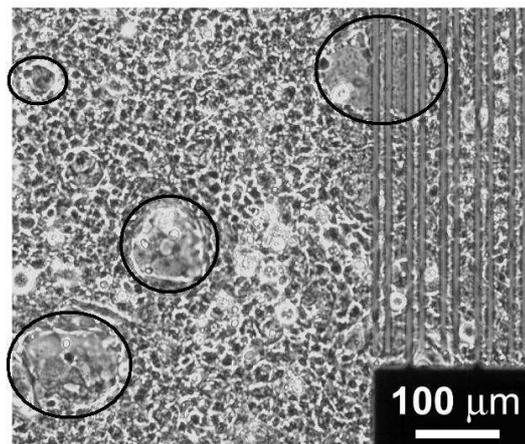


図(1)-6. LiTaOx SAW チップ上に播種したSN&Ecad細胞の走査型(A)及び透過型(B)電子顕微鏡写真。培養期間は2週間。

位相差顕微鏡による観察では、培養期間が2週間に達する辺りから、所々細胞がドーム形成により脱落しては周囲の細胞が伸展移動して覆われた個所が認められるようになった (図(1)-7)。

以上のことから、

- ①擬似マトリックスをコートすることは、細胞・基質間結合のみならず、細胞・細胞間結合にも重要である。
- ②SAWチップ上における上皮細胞の培養期間は、現時点では2週間が最長と推測される。



図(1)-7. LiTaOx SAW チップ上に播種したSN&Ecad 細胞の位相差顕微鏡写真

培養条件は、図(1)-6 と同じ。○印で囲んだ個所では、局所的な細胞の脱落后に細胞伸展が起こったことを伺わせる。

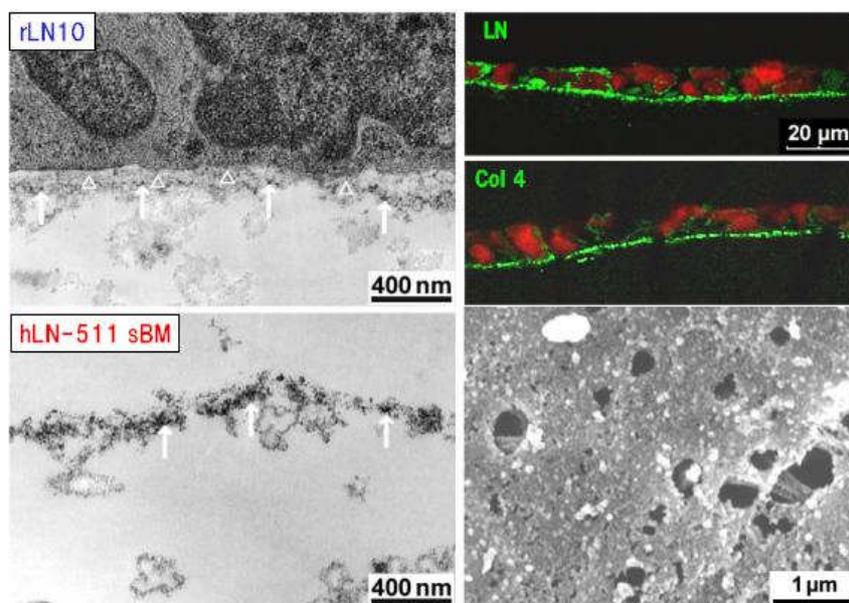
(2) 多角的毒性検査に適した影響評価細胞の種類を拡充する方法

東京電機大学の報告に記載。

(3) ヒトES細胞からの影響評価細胞の調製

1) ヒトラミニン-511 の基底膜基質の作製

これまでは、先ず culture insert のプラスチック性多孔性薄膜上にI型コラーゲン線維基質を作製した。次に、そのI型コラーゲン線維をMAST-oligoGlcNAc でコートした上に、ヒトラミニン-511 を遺伝子導入したHEK293 recombinant (rLN-10 細胞)を播種することで、ラミニン-511 の基底膜構造体を形成した。最後に、形成された基底膜構造体は温存し、rLN-10 細胞のみを除去することにより、基底膜基質 (rLN10-sBM) を調製した^{1, 3)} (図(1)-8)。

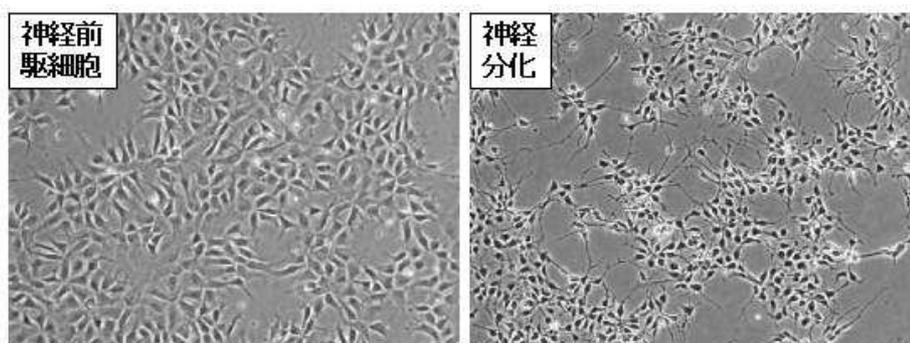


図(1)-8 rLN10細胞を用いて作製した rLN-511 sBM¹⁾

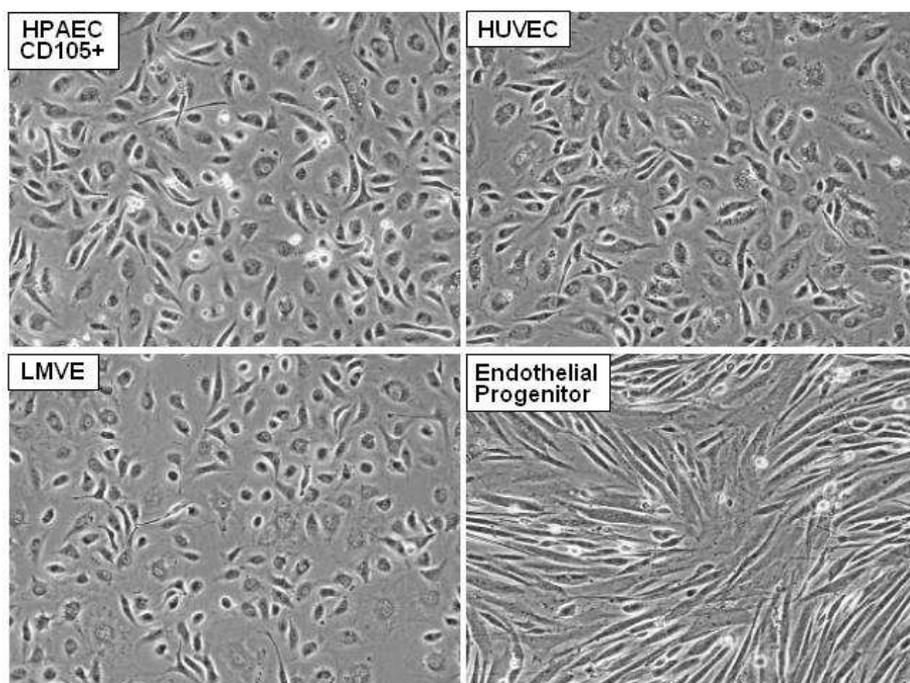
rLN10細胞の基底面直下に基底膜緻密板が形成され、細胞の除去によって基底膜が露出する。基底膜には、構成成分のラミニンやIV型コラーゲンの集積が認められる。左図において、上図は細胞を剥離する前、下図は細胞剥離後のTEM。↑は基底膜緻密板、△はanchoring filaments。右下図は、細胞剥離後の基底膜表面のSEM。基底膜構造体の穴から、下部のコラーゲン線維が覗き見える。免疫蛍光染色像（右上中）において、緑色はラミニンやIV型コラーゲン蛋白の集積個所を示す。赤は核染色。

しかしながら、この方法はルーティンの継代培養には向いていない。また、分化誘導を掛けて多量の成熟細胞を調製するにも適さない。そこで、rLN10-sBMの調製方法を簡素化した。まず、I型コラーゲン線維基質作製の工程を省き、培養ウェルや培養フラスコに直接MAST-oligoGlcNAcコートした後、rLN-10細胞を播種して、基底膜基質（rLN10-p.sBM）を作製した。このrLN10-p.sBM基質上で、hES由来の前駆細胞を播種・培養した(図(1)-2)。

従来の考えに従えば、hES細胞を培養して影響評価細胞に分化誘導するのが穏当である。しかし、この分化誘導には、一般に長期間の培養を必要とする点、目的の細胞以外の細胞にも分化が起こる点、目的の成熟細胞を単離する際に細胞傷害を起こす恐れや細胞数の損出、異なる細胞の混入等を勘案すると、影響評価細胞を調製する方法としては著しく効率が悪い。そこで、市販のhES由来前駆細胞を雛形として、前駆細胞として継代・増殖させることが出来るか、また、必要に応じ成熟細胞に誘導できるか検討した。その結果、神経前駆細胞については、図(1)-2の方法で継代培養でき、BDNF (Brain-derived neurotrophic factor)の添加によって、安定した神経分化が実現した(図(1)-9)。しかし、血管内皮前駆細胞につい



図(1)-9 hLN-511基底膜基質上での神経前駆細胞の継代培養と神経分化



図(1)-10 hLN-511基底膜基質上での血管内皮前駆細胞の継代培養

では、他の細胞外マトリックスを用いた場合よりも、細胞の形態も比較的整っていたが、HPAEC (Human Pulmonary Arterial Endothelial Cell)、HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell)、LMVE (Lung MmicroVascular Endothelial Cell) の様には、分化誘導できなかつた(図(1)-10)。血管内皮細胞は、環境影響評価細胞として重要であり、ラミニン-511の基底膜基質(rLN10-p.sBM)に代わって、血管内皮組織の直下に存在する基底膜成分であるラミニン-411等の基底膜基質を開発し、成熟した内皮細胞への分化誘導に向けて更に検討を進める必要がある。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

a) 電子素子上での細胞培養

従来、培養細胞による *in vitro* 毒性試験は、プラスチック培養皿内で培養された細胞に試験物質を投与し、生化学的、形態学的影響を解析して、試験物質の毒性を評価するのが常套手段であった。今回、絶縁処理を施した表面弾性波 (SH-SAW) 素子上での細胞培養が可能になったことで、細胞が被る生体影響を直接 SH-SAW 素子の特性を活かして計測することが可能になった。

本研究で開発したのは、従来の抗体や酵素を用いた抗体型や酵素型バイオセンサの様に、単に特定物質の計測を行うのではなく、環境汚染物質や環境化学物質による生体影響を「細胞や組織に対する機能的・構造的変化」として計測する、新しい概念に基づくバイオセンサである。

b) 電子素子の表面改質

電子素子上で細胞培養を可能にする新規手段が提示された。培養細胞を電子素子表面に細胞接着させるためのインターフェースとなる化学合成 (擬似) マトリックスの発明である。擬似マトリックスは、SH-SAW 伝搬面の表面構造に適合した疎水性側鎖 R を選択することで、LiTaOx 伝搬面に安定結合した。この表面改質によって、SH-SAW の伝搬面で安定した細胞接着が可能になった。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

特定物資をモニターするのではなく、細胞や組織に対する機能的・構造的変化を計測できるバイオナノ協調体を用いることで、これまで本格的な健康影響評価が手つかずだった環境化学物質について、相互に比較が可能な形で毒性試験が可能になる。その結果を元に、毒性をランク付けし、監視対象の絞り込みと重点化に貢献できる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文 (査読あり) >

- 1) H. OTORI, T. HIGASHIYAMA, A. UEHARA, M. KAINUMA, Y. KUDO, T. KAMIMURA, T. KON, K. MOCHITATE, H. KIKUCHI, Y. FURUYA, *Sensors and Actuators: A, Physical*
“Signal Change of Surface Acoustic Wave (SAW) Caused by H₂O₂ Damage to SV40-T2 Cells Cultivated on SH-SAW Sensor.” (in press)
- 2) N. SHIRAKI, T. YAMAZOE, Z. QIN, K. OHGOMORI, K. MOCHITATE, K. KUME, and S. KUME. *PLoS One* 6(8):e24228 (2011) Efficient Differentiation of

Embryonic Stem Cells into Hepatic Cells in vitro Using a Feeder-Free Basement Membrane Substratum.

- 3) Y. HIGUCHI, N. SHIRAKI, K. YAMANE, Z. QIN, K. MOCHITATE, K. ARAKI, T. SENOKUCHI, K. YAMAGATA, M. HARA, K. KUME and S. KUME. Synthesized Basement Membranes Direct the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Pancreatic Lineages. *J. Cell Sci.* 123: 2733-2742 (2010)

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 永野麗子, 細川剛, 古山昭子, 持立克身: 基底膜構造体を培養基質に人工組織の構築, 移植, vol.43, 10-16 (2008)
- 2) 細川剛, 永野麗子, 持立克身: 再構成基底膜構造体sBM基質—精緻な人工組織構築を可能にする培養基質—, 進み続ける細胞移植治療の実際(上巻), 遺伝子医学MOOK別冊, 211-217 (2008)
- 3) 岩田博夫監修: 再生医療製品の許認可と素子工学の新しい試み、シーエムシー出版、109-117 (2012) 「基底膜基質を用いた組織構築と化学合成マトリックスによる簡素化（執筆担当：持立克身, 古屋昭子, 白木伸明）」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 上原 篤詞, 貝沼 美帆, 古屋 泰文, 成田 絵里子, 今 大健, 持立 克身:
第4回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム講演要旨集, 27pp. (2010)
「培養細胞の表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子ナノ・バイオセンサ」
- 2) 上原篤詞, 貝沼美帆, 古屋泰文, 成田絵里子, 今大健, 持立克身:
日本金属学会講演概要, 2010年秋季(第147回)大会, p. 170 (2010),
「培養細胞による表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子バイオセンサ」
- 3) 上原篤詞, 古屋泰文, 貝沼美帆, 今大健, 持立克身:
第20回インテリジェント材料/システムシンポジウム講演要旨集, pp. 10, (2011)
「培養細胞の表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子バイオセンサ」
- 4) M. Kotaka, Z. Qin, N. Shiraki, K. Umeda, K. Kume, S. Kume, and K. Mochitate.
Functional hepatic tissue reconstruction with primary hepatocytes on synthesized basement membrane substratum and its application to ES cell differentiation to hepatocytes. *KEY Forum in Developmental Biology and Regenerative Medicine, Global COE and IMEG. Sep 8–9, 2011.*
- 5) 持立克身, 条昭苑, 曾勤, 小高真希, 白木伸明, 樋口裕一郎, 永野麗子: 日本結合組織学会・マトリックス研究会合同シンポジウム2 “再生医療・臓器再生・人工臓器とマトリックス工学” (2011) 「基底膜構造体を培養基質に用いた幹細胞の分化と機能発現」
- 6) 柴田昌宏, 相澤典男, 高野温, 大鳥秀貴, 今大健, 古屋泰文, 持立克身, 田中真人, 福井康裕, 二井信行: 生体医工学シンポジウム2012 (2012)
「培養細胞単層の粘弾性測定の横波表面弾性波による計測」
- 7) 大鳥秀貴, 上原篤詞, 貝沼美帆, 工藤優佳子, 東山拓海, 今大健, 持立克身, 菊池英明, 古屋泰文: 第21回インテリジェント材料システムシンポジウム (2012)

「表面弾性波(SH-SAW)基板に培養した細胞の損傷による信号変化」

- 8) 高野温, 柴田昌宏, 大鳥秀貴, 今大健, 古屋泰文, 持立克身, 福井康裕, 田中真人, 二井信行: 日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会 2012 (2012)
「オンチップ CO₂ インキュベーション下で培養した細胞の表面弾性波による挙動解析」
- 9) 東山拓海, 大鳥秀貴, 貝沼美帆, 工藤優佳子, 持立克身, 菊池英明, 古屋泰文:
日本機械学会東北学生会第42回卒業研究発表講演会 (2012)
「SAW デバイス基板上の SV40-T2 培養細胞の薬液(過酸化水素)損傷に伴う SH-SAW 信号変化」
- 10) H. Otori, A. Uehara, M. Kainuma, Y. Kudo, T. Higashiyama, T. Kon, K. Mochitate, H. Kikuchi, Y. Furuya: The International Workshop on Piezoelectric Materials and Applications (IWPMA) 2012 (2012),
“Signal Change of Surface Acoustic Wave (SAW) by H₂O₂ Damage to SV40-T2 Cells Cultivated on SH-SAW Sensor”
- 11) 東山 拓海, 大鳥 秀貴, 工藤優佳子, 磯野 晶宏, 今 大健, 持立 克身, 菊池 英明, 古屋 泰文: 第 22 回インテリジェント材料/システムシンポジウム (2013)
「SH-SAW 電極間に培養した SV40-T2 細胞の薬液損傷モニタリング」

(3) 出願及び成立特許

- 1) Katsumi MOCHTATE: Cell culture medium and immobilized preparation of cell adhesion protein or peptide. US Patent No. 8304238 (特許査定, 2012年11月6日)
- 2) Katsumi MOCHTATE: Method of preparing basement membrane. EU Patent No. 1437147 (特許査定, 2012年6月27日)
- 3) Katsumi MOCHTATE: Method of preparing basement membrane, method of constructing basement membrane specimen, reconstituted artificial tissue using the basement membrane specimen and process for producing the same. US Patent No. 7,972,852 (特許査定, 2011年7月05日)
- 4) Katsumi MOCHTATE: Method of preparing basement membrane, method of constructing basement membrane specimen, reconstituted artificial tissue using the basement membrane specimen and process for producing the same. US Patent No. 7906332 (特許査定, 2011年3月15日)
- 5) Katsumi MOCHTATE: Method of preparing basement membrane, method of constructing basement membrane specimen, reconstituted artificial tissue using the basement membrane specimen and process for producing the same. US Patent No. 7399634 (特許査定, 2008年7月15日)
- 6) 持立克身: 細胞培養基質および細胞接着蛋白質またはペプチドの固相化標品. 特許No. 4555753 (特許査定, 2010年7月23日)
- 7) 持立克身: 基底膜標品の作製方法. 特許4214287 (2008年11月14日)
- 8) 二井信行・田中真人・持立克身: マイクロ流体チップ及び細胞の培養方法. 特許公開 2011-206045 (2011年10月20日)

- 9) 持立克身・古屋泰文・細川直裕・林芳幸・三枝康孝・今大健：表面弾性波デバイスバイオセンサ．特許公開2009-002677 (2009年1月8日)

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 持立克身、他弘前大学理工学部，東京電機大学生命工学科．人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発．ナノテクノロジー2012展，2月15-17日，1212．東京

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) N. Shiraki, T. Yamazoe, Z. Qin, K. Ohgomori, K. Mochitate, K. Kume, and S. Kume. PLoS One 6(8):e24228 (2011) Efficient Differentiation of Embryonic Stem Cells into Hepatic Cells in vitro Using a Feeder-Free Basement Membrane Substratum.
- 2) Y. Higuchi, N. Shiraki, K. Yamane, Z. Qin, K. Mochitate, K. Araki, T. Senokuchi, K. Yamagata, M. Hara, K. Kume and S. Kume. Synthesized Basement Membranes Direct the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells into Pancreatic Lineages. J. Cell Sci. 123: 2733-2742 (2010)
- 3) 岩田博夫監修：再生医療製品の許認可と素子工学の新しい試み、シーエムシー出版、109-117 (2012) 「基底膜基質を用いた組織構築と化学合成マトリックスによる簡素化（執筆担当：持立克身，古屋昭子，白木伸明）」
- 4) 鈴木喜晴，野水基義：ラミニンアイソフォームの活性部位の多様性と相同性．生化学 73：1215-1220 (2001)

(2) SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究：細胞培養用SH-SAWデバイスの開発

弘前大学

大学院理工学研究科

(株) リバーエレテック

古屋 泰文・大鳥 秀貴

今 大建 (研究協力)

平成21～24年度累計予算額：30,540 千円（うち、平成24年度予算額：5,299 千円）

予算額は、弘前大学（(2)、(3)章）としての予算額であり、間接経費を含む。

平成20年度はナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

[要旨]

細胞の集合体である生体組織が外部から受ける種々の刺激（化学的・物理的刺激）に対して生ずる初期反応を、電子素子の特性を活かして直接捕捉することで、複合した環境汚染物質等による生体影響を短時間で評価する方法の開発を目指した。本研究では、細胞培養液中でも伝搬中のエネルギー減衰が少ない水平せん断型表面弾性波（SH-SAW：Shear Horizontal Surface Acoustic Wave）に着目し、培養細胞とSH-SAWチップの一体化（SH-SAWバイオナノ協調体）を図ることで、測定のリアルタイム化を実現した。

- (1) バイオセンサとして最適なSAWセンサの基本設計に、開放型浮き電極を採用することで、シングル電極の場合と比べ、ノイズ成分（リップル）の低減化に成功した。
- (2) バイオセンサとしてのSH-SAWの計測原理を解析した。SH-SAWの伝搬面上で直接培養する細胞としては、大気汚染物質の代表的標的組織である肺胞上皮として、ラット不死化肺胞2型上皮（SV40-T2）細胞を選択した。
- (3) 大気汚染物質による酸化的ストレスを試験評価するために、過酸化水素をモデル化合物に選択し、培養SV40-T2細胞における密着結合の崩壊が、SH-SAW信号に及ぼす影響を計測した。主に誘電率を検出するOPENチャンネル(.ch)では、密着結合に局在するZO-1蛋白の局在性喪失と平行して、SH-SAWの挿入損失差と位相差が減少した。他方、主に機械的影響を検出するSHORT.chでは変化がなかった。これらの結果から、過酸化水素による密着結合の崩壊とそれから派生する細胞内変化によって、細胞内及び近傍の誘電率が変化し、OPEN.chのSH-SAW信号変化に至ったと推測している。

[キーワード]

SH-SAW、誘電率、SV40-T2、密着結合、過酸化水素

1. はじめに

産業技術の急激な発展による環境汚染や公害は、人体を危険に曝し、技術の進歩による新たな問題が今後も発生することが予測されており、このような問題を防止する技術が必要とされている。しかし、環境中に存在する多種多様な生体への有害物質の安全性や、新たな医薬品の効果を評価する現存の方法では高額な装置が必要であり、評価時間もかかる。また、信頼性の高い評価方法として動物実験があるが、動物の個体差などにより複数回行う必要があり、倫理

面の問題も軽視できない。そのため、これらの方法に取って代わる、より簡便で安価な評価方法の開発が急務となっている。

近年、細胞・組織レベルの機能を計測するバイオセンシング技術が発展して来ている。細胞は生命活動の最小単位で、細胞の集合体である組織は細胞の高度機能発現のための構造であり、生体が外部から受ける種々の刺激（化学的・物理的刺激）に対して最初の反応をする。この初期反応を捉えることができれば、種々の刺激が生体へ与える影響や効能を短時間で評価する方法へと発展させることができる。即ち、従来型の抗体や酵素を用いた抗体型／酵素型バイオセンサのように、単に特定物質の計量を行うのではなく、医療医薬品、化学物質、環境汚染物質が生体に与える影響を「細胞や組織に対する機能的・構造的変化」として計測する次世代バイオセンサ（**バイオナノ協調体**）の構築が可能となる¹⁾。このバイオセンシング技術では、細胞が発信する信号をその場で計測するために、デバイス上で細胞・組織を培養するなど、培養系と検出系の一体化によるモニタリング技術が求められる。

本研究では、表面弾性波（SAW：Surface Acoustic Wave）に着目した。SAWは表面にエネルギーが集中しているため表面性状により伝搬特性が変化する。特に水平せん断型表面弾性波（SH-SAW：Shear Horizontal SAW）は水溶液中でもエネルギーの減衰が少ないため、細胞培養液中でのセンシングが可能である。このため、SH-SAW伝搬面に細胞を培養し、細胞の存在状態に起因するSH-SAW伝搬特性の変化を捉えることができれば、複合した環境有害因子が細胞・組織に与える影響をリアルタイムに検出できるバイオセンサとなり得る。現在、超音波を用いた生物診断・評価は広く検診などに利用されており、細胞に対して無害と考えられており、バイオセンサへの適用にはさしたる問題を抱えていない。本研究では、SH-SAWを用いたバイオナノ協調体開発の一環として、SH-SAWデバイスの設計・性能評価、及び、SH-SAW伝搬面に細胞を培養し、細胞の存在状態に起因するSAW信号の変化について解析した。

2. 研究開発目的

本研究では、SH-SAWを用いたバイオセンシングを提案する。図(2)-1にSH-SAWを用いたバイオセンサの概念図を示す。SH-SAW伝搬面上に細胞を培養し、種々の刺激に対する細胞の応答によりSH-SAW伝搬特性が変化する。

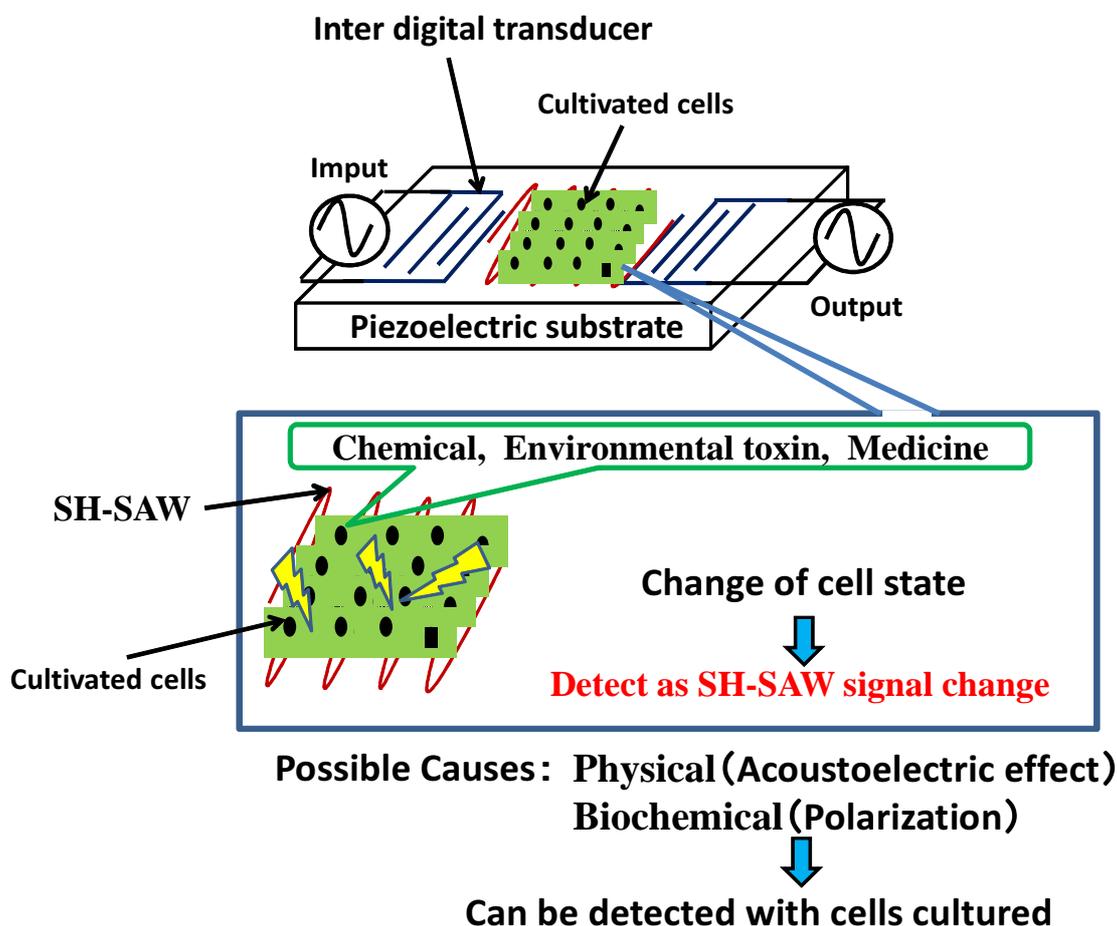
提案するバイオセンサの特徴を列挙すると以下のようになる。

- ①細胞を直接SH-SAW伝搬面上に培養できるため、培養系と検出系を一体化でき、リアルタイムな検出が可能となる。
- ②特定物質の定量によるバイオセンシングとは異なる。複合した有害因子が細胞・組織の機能や構造に与える影響を、SH-SAW伝搬波の特性変化として計測する。
- ③SH-SAWは、エネルギーが伝搬媒質表面に集中している。このため、細胞・細胞間結合の崩壊やSH-SAWセンサと細胞との接着面における接着力の変化を、SH-SAWの信号変化として計測できる可能性が高い。
- ④小型で安価である。

このSH-SAWバイオセンサの実現のため、SH-SAWデバイス設計と性能評価を行った。また、SH-SAW伝搬面に細胞を直接培養し、培養細胞の状態変化がSH-SAWデバイス信号に与える影響について調べた。特に、SH-SAW伝搬経路上にSV40-T2（ラット不死化肺胞2型上皮）細胞を

培養することによる、更には過酸化水素によるSV40-T2 細胞の傷害とSH-SAW伝搬特性の変化との相関性に関して比較検討した。

SH-SAW Bio sensor



図(2)-1. SH-SAWバイオセンサの概略図

3. 研究開発方法

(1) SH-SAWデバイスの開発

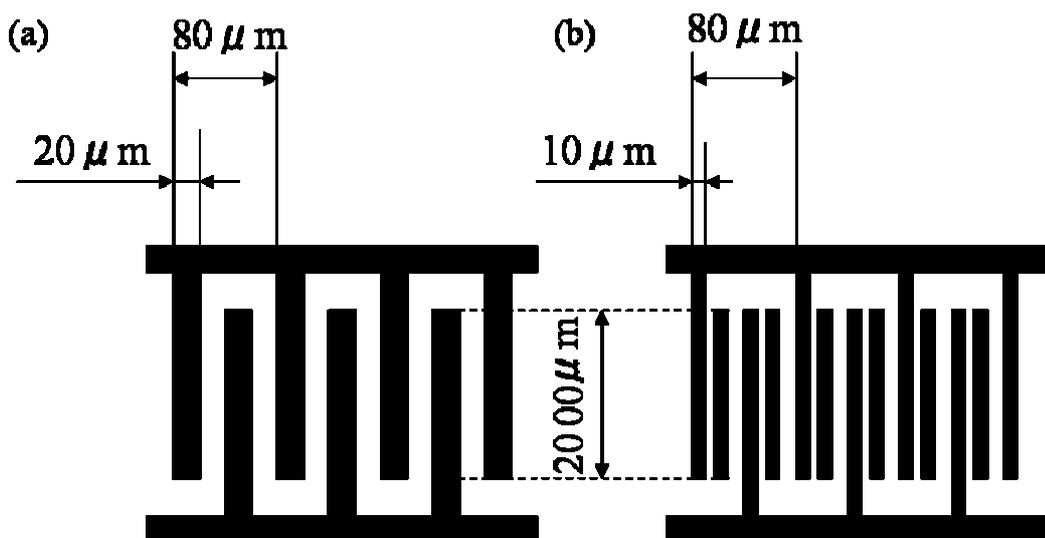
1) 圧電基板の選定

本研究ではデバイスが培養液中にある状態で測定を行う。そのため、培養液中でSH-SAWが伝搬することが条件となり、液中でも減衰が少ないSH-SAWを励振する圧電基板に限られる。そこで、液相センサなどの研究に多く用いられているLiTaO₃に着目した²⁾。表(2)-1にSH-SAWを励振するLiTaO₃ 36°Y-XカットとLiTaO₃ 42°Y-Xカットの基本特性を示す³⁾。LiTaO₃では、42°Y-Xカットのほうが36°Y-Xカットに比べて電気機械結合係数が大きく伝搬損失が少ない。このため、LiTaO₃ 42°Y-Xカットを用いた。

	LiTaO ₃	
	36°Y cut	42°Y cut
Propagation direction	X	X
Electromechanical coupling coefficient [%]	5.0	7.6
Temperature coefficient of delay [ppm/°C]	-28~-32	-40
Velocity of SAW [m/s]	4160	4022

表(2)-1. Characteristics of LiTaO₃ substrate (36°Y cut and 42°Y cut)2) IDTの設計a) IDTの構造

IDTの特性を決定する要因として、1周期当たりのIDTの構造が挙げられる。SAWデバイスに用いられるIDTの設計で、最も基礎的なIDTの構造はシングル電極と呼ばれる。この構造では、電極の両側に等しい大きさのSAWを励振する双方向性を持っているため、エネルギーの一部しか受信できず挿入損失が大きくなることや、送受間IDTの反射により生じるTTE (Triple Transit Echo) によってリップルが生じる³⁾。この解決策としてSAWに方向性を持たせる一方向性IDT (Unidirectional IDT) を利用することが考えられる。一方向性IDTには様々な種類があるが、作製可能であるIDTの幅やIDT間距離、作製工程を考慮し、開放型浮き電極を正・負励振電極間の中心からずらした位置に配置することで方向性を得るOFEUDT (Open Floating Electrode type Unidirectional Transducer) を作製し、シングル電極との周波数特性の比較を行った。図(2)-2 (a) にシングル電極構造、(b) にOFEUDT電極構造の概略図を示す。両電極とも波長を80 μmとして中心周波数を50 MHzに設計した。



図(2)-2. Schematic of IDT structure. (a) Single design. (b) OFEUDT design

b) IDTの電極対数

IDTの特性を決定するもう一つの要因として電極対数が挙げられる。IDTの正負2電極を電極対と呼び、IDT電極指数を数える時の単位として利用される。IDTの電極対数はSAWフィルタの帯域幅に関係する。以下に関係式を示す。

$$2f_0/n = \text{帯域幅} \quad \dots (3-1)$$

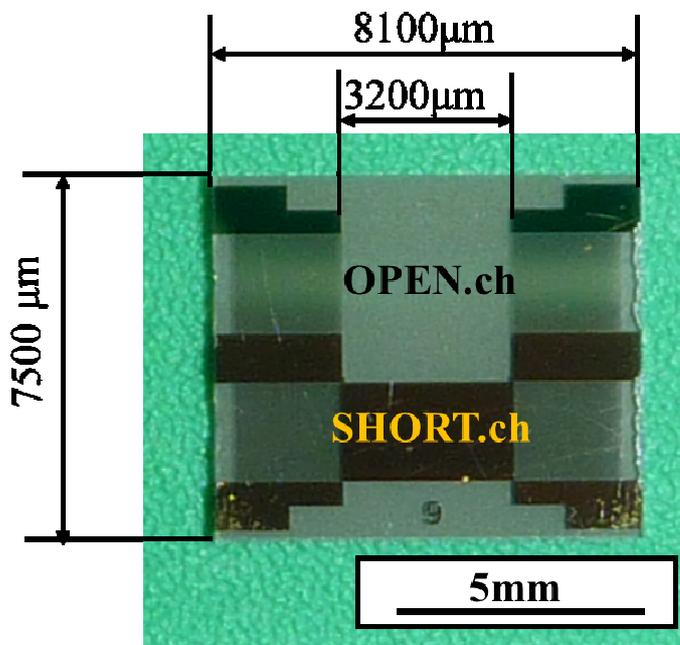
f_0 : 中心周波数 n : 電極対数

この式より電極対数が多くなると帯域幅が狭くなり、狭帯域フィルタとなる。狭帯域であることはセンサとして鋭い共振を有するため、広帯域のセンサより大きな変化量を得られる。しかし、電極対数を多くするとTTEの影響が大きくなりリップルが増加すると考えられる。そのため、OFEUDTの対数5、15、25の3種類を作製し比較を行った。

3) SH-SAWデバイスの作製

図(2)-3 に今回作製したSH-SAWデバイスの写真を示す。膜厚はクロム接着層100ÅとAu 1000Åの計1100Åとし、(株)リバーエレテックにてフォトリソグラフィ工程により作製した。すべての測定において、SH-SAWデバイスの端面は、SH-SAWの反射を低減するために削っている。

SH-SAW伝搬面には物理的な変化と電気的な変化を検出するOPEN.chとAuの薄膜により短絡させて物理的な変化のみを検出するSHORT.chを作製した。



図(2)-3. Photograph of SH-SAW device

4) 測定回路基板の設計

回路には測定機器であるネットワークアナライザとのインピーダンスマッチング (50Ω) を行うためにマイクロストリップラインを用いた。マイクロストリップラインの特性インピーダンス Z_0 は以下の式で与えられる⁴⁾。

$$Z_0 = \frac{377}{\sqrt{\varepsilon} \left(\frac{w}{h} + 2 \right)} \quad \dots (3-2)$$

ε : 誘電体層の比誘電率 w : ライン幅 h : 誘電体層の厚さ

この式より、今回用いたFR-4ガラスエポキシ基板 (サンハヤト社製 NZ-G33KR) は比誘電率 4.6、誘電体層の厚さ 1.6 mm であるため、マイクロストリップライン幅を 2.7 mm で作製した。この基板にSH-SAWデバイスを接着し、デバイスの電極とマイクロストリップラインを導電性ペースト (藤倉化成 ドータイトD-550) で接続した。

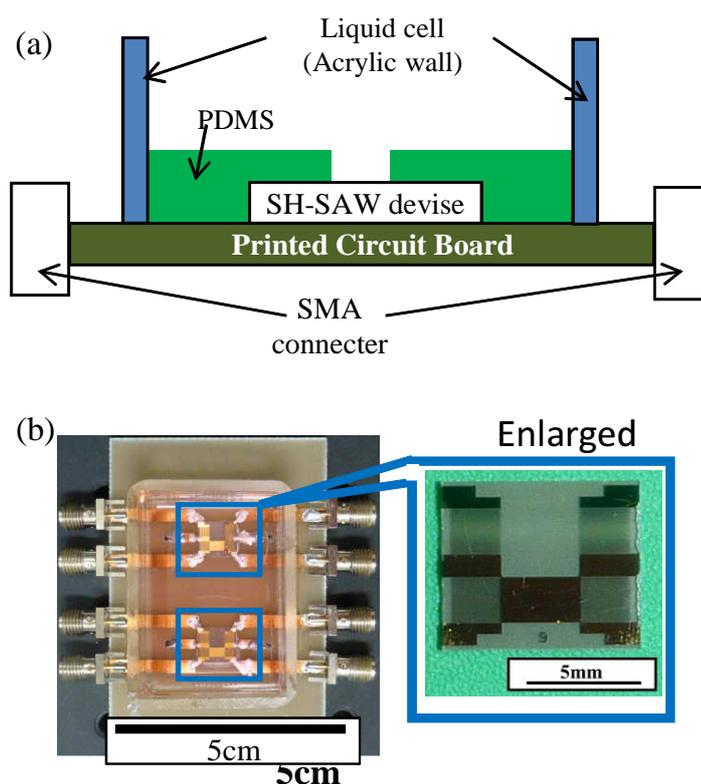
5) ネットワークアナライザ

SH-SAWの周波数特性は、ネットワークアナライザ (Agilent社製E5062A) を用いて測定した。ネットワークアナライザは測定物の高周波信号に対する伝送特性や反射特性などの電気的特性を解析する機器である。ネットワークアナライザではSパラメータ (Scattering parameter) で高周波ネットワークを特性化する。高周波におけるデバイスポートの電圧や電流測定では、電流計や電圧計を接続した場合、プローブ自体に無視できないほどのインピーダンスがあるため非常に困難であるが、Sパラメータを用いた場合では負荷を接続する必要がない。2ポートデバイスには4つのSパラメータがあり、Sの後の最初の番号は高周波信号が出るポートで、2番目の番号は高周波信号が入るポートを表している。このSH-SAWデバイスは、バイオセンサとしてSH-SAW伝搬面に細胞を培養し、その変化によるSH-SAW伝搬特性の変化を検知することが目的である。そのため、SH-SAWデバイスは高周波信号が通過する伝送特性 (S_{21}) における挿入損失と位相について測定を行った。

(2) SH-SAWデバイスの性能評価

1) SH-SAWセンサの作製

図(2)-4 に作製したSH-SAWセンサの写真を示す。SH-SAWセンサにはSH-SAWデバイスを2つ搭載し、片方のデバイスを細胞の変化を測定するSensor.chとし、もう片方のデバイスを温度や質量の変化を測定するReference.chとした。この両デバイスの差を取ることで温度と質量の変化を補正した。測定回路にはSH-SAWデバイス評価と同様のものを用いた。細胞培養の際、培養液を保持するためにアクリルで40×30×12mmのプールを作製した。SH-SAW伝搬面以外にPDMS (ポリジメチルシロキサン) をコートし絶縁処理を施した。PDMSの固化条件は70℃で2hとした。



図(2)-4. SH-SAW biosensor

(a) Schematic illustration. (b) Photograph.

2) SH-SAWセンサの基礎特性評価方法

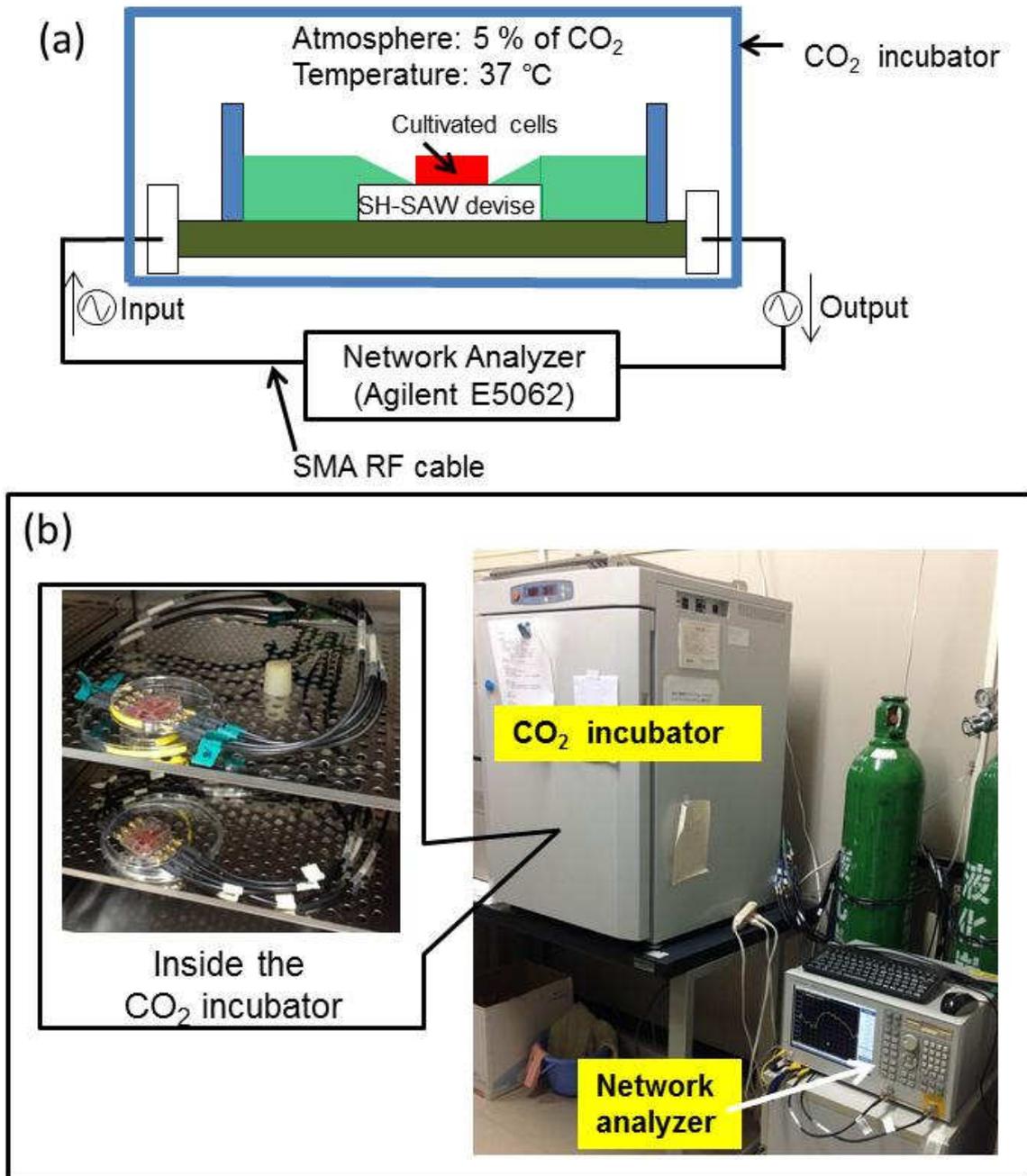
SH-SAWデバイスのIDT上に形成した SiO_2 膜の膜厚や形状の条件により挿入損失が30dB以上の増加を引き起こすと報告されている⁵⁾。このようにSH-SAWデバイスのIDT上に物質を形成する場合、SH-SAWの周波数特性の劣化に気を付けなければならない。SH-SAWセンサの作製では、(2)-2) 節の通り、SH-SAWセンサにPDMSで絶縁処理を施している。この処理は、SH-SAWデバイス伝搬部以外であるがIDT上にも行うため、この処理によるSH-SAWセンサの特性への影響について評価した。また、センサは、SH-SAW伝搬部に直接細胞を培養するため、プールが培養液で満たされる。そのため、液中でSH-SAWが実際にセンサとして必要な信号を検知可能であるかを調べた。基礎実験として純水、グリセリン水溶液、イソプロピルアルコール (IPA) 水溶液を用い、SH-SAW伝搬表面の性状変化によるSH-SAWデバイスの信号変化を調べた。さらに、温度特性も調査した。測定は2章のSH-SAWデバイス評価と同様にネットワークアナライザを用いて行った。

(3) SH-SAWバイオセンサによるバイオセンシング

1) 計測システムのセットアップ

SH-SAWデバイス信号は温度変化の影響を受けやすいため、計測環境の温度変動を最小限にした計測システムを構築することが重要である。細胞培養環境である炭酸ガス培養器(CO_2 インキュベータ)は温度：37°C、 CO_2 濃度：5%に保たれている。そのため、 CO_2 インキュベ-

タ内にセンサを設置することで温度一定条件下で実験が遂行できると考えた。図(2)-5 にセットアップを示す。CO₂インキュベータ内に設置されたSH-SAWバイオセンサはSMA-RF ケーブルにより計測器であるネットワークアナライザに接続されている。なお、ケーブルはエチルアルコールにより滅菌消毒を行い、コンタミネーションが起らないようにした。CO₂インキュベータ背面にある孔からケーブルを外に出し、シリコン栓やエポキシ系樹脂などで隙間をふさぎCO₂が外に漏れないようにした。これにより、細胞を培養している過程においてセンサの温度が変動しない状態での計測が可能となった。



図(2)-5. Experimental setup of cells cultivated on SH-SAW biosensor

(a) Schematic illustration.

(b) Photographs of CO₂ incubator, Network analyzer, and SH-SAW bio-sensors were connected to Network analyzer via SMA-RF cable.

2) 過酸化水素による細胞傷害

a) 過酸化水素による細胞傷害下でのSH-SAW信号計測

本研究で用いたSV40-T2細胞は過酸化水素により細胞-細胞間結合（タイトジャンクション）が損傷を受けることが報告されている^{7) 8)}。タイトジャンクションとは密着結合とも言われ、細胞膜同士を完全に密着させて上皮細胞同士の間隙を塞ぐ役割を持つ細胞間接着構造である。また、脳の血管上皮細胞などの場合も同様に、血流から脳に有害な物質の進入を防ぐ機構として脳関門があり、タイトジャンクション構造がその役割を果たしていると考えられている⁹⁾。また、細胞のApical側とBasal側の極性を維持する役割もある¹⁰⁾。密着結合の劣化は、生体組織の外側と内側を区別する構造が脆弱になったことを意味し、外界からの異物の侵入に対し防御ができなくなることにつながり、生命の危機に至る。この過酸化水素が細胞へ損傷を与える過程とSH-SAWの伝搬特性変化との相関性を調査するために、細胞培養後48hに過酸化水素 1 mM を投与しSH-SAWシグナルの測定を行った。

b) 免疫蛍光染色によるSV40-T2細胞におけるタイトジャンクション崩壊の経時的観察

SH-SAWシグナルとタイトジャンクション崩壊の関係を調査する実験を行った。SV40-T2細胞のタイトジャンクションを構成するタンパク質であるZO-1を Molecular Probes™ Alexa Fluor 488、細胞核をSigma™ Hoechst 33258でそれぞれ免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。過酸化水素による密着結合の状態変化とSH-SAW信号との相関性を調べた。

c) 免疫蛍光染色によるSV40-T2細胞のZO-1局在性の観察

続いて、Z軸方向（細胞表層-基底 方向）におけるZO-1の局在を観察するため、過酸化水素を投与したものと投与しないものでZO-1を免疫蛍光染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3) 表面弾性波の測定方法

測定は2章のSH-SAWデバイス評価と同様にネットワークアナライザを用いて行った。測定時のランダムノイズ低減のため、ここでは掃引アベレージングを行った。掃引アベレージングは、

$$A_n = \frac{S_n}{F} + \left(1 - \frac{1}{F}\right) \times A_{n-1} \quad \dots (3-3)$$

A_n : 測定点の n 回目の掃引における掃引アベレージング計算結果
(ベクトル量)

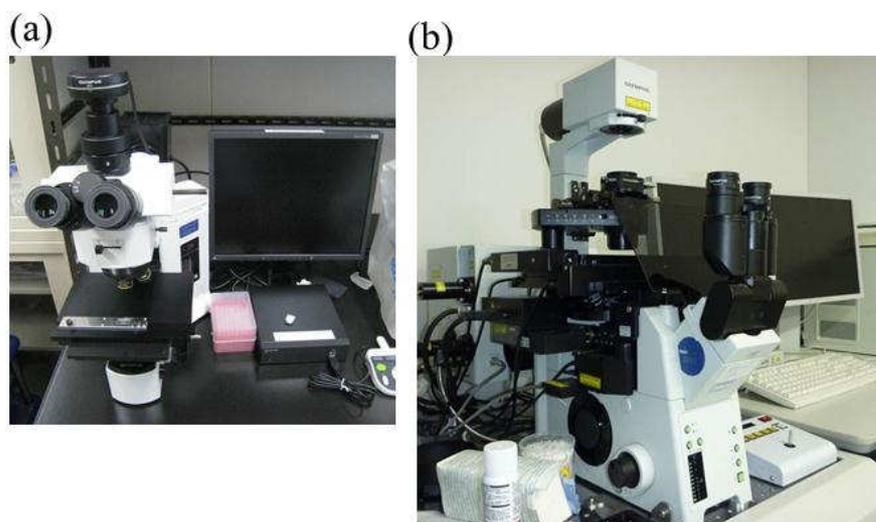
S_n : 測定点の n 回目の掃引における測定値 (ベクトル量)

F : 掃引アベレージング回数

で計算される。本研究ではアベレージング回数は有効にランダムノイズが低減できることが確認できている10回にて実験を行った。

5) 細胞観察について

図(2)-7 にSV40-T2細胞の観察に使用した顕微鏡写真を示す。(a)は培養過程と損傷過程の観察に使用した光学顕微鏡(オリンパス社製BX51M-N33MB)、(b)はタイトジャンクションの観察に使用した共焦点レーザ顕微鏡(オリンパス社製 FV1000)である。



図(2)-6. Photographs of microphotographic apparatus.

(a) Optical micro scope. (b) Laser confocal microscope.

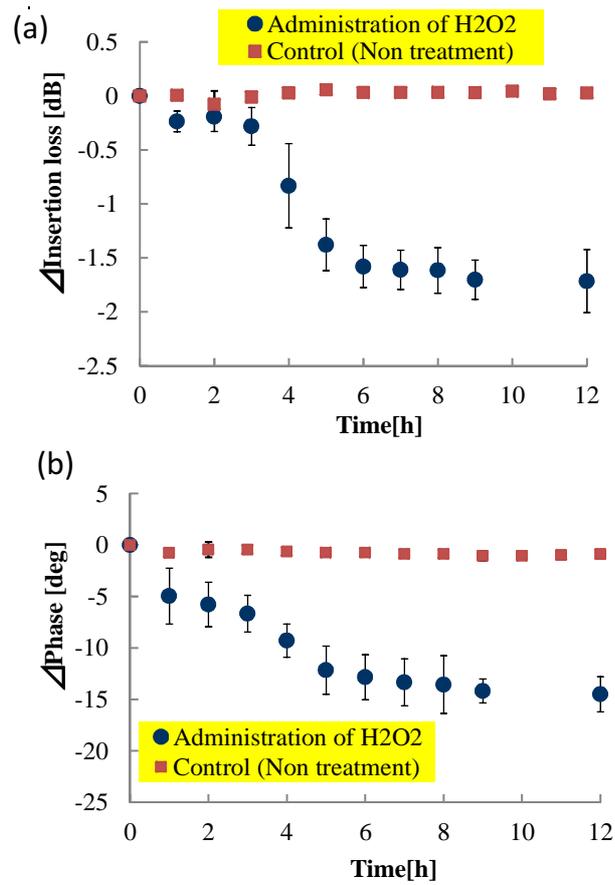
4. 結果及び考察

(1) SH-SAWバイオセンサによるバイオセンシング

1) 過酸化水素による細胞損傷

a) 過酸化水素による細胞損傷下でのSH-SAW信号計測

図(2)-7 にOPEN.ch における細胞損傷過程の測定結果を示す。ここでは、0hの最少挿入損失点における周波数を基準とし、この周波数における変化を調べた。(a)は挿入損失差、(b)は位相差である。コントロールは、過酸化水素を投与していないグループである。OPEN.ch では、細胞を播種・培養する過程で共に増大した挿入損失差、位相差が、過酸化水素の添加によって逆に減少する傾向、即ち、細胞播種前の時点に回帰する傾向を示した。また挿入損失差、位相差は、過酸化水素の添加3hから6hにかけて最も大きな減衰を示した。その後の信号変化は、飽和に達した。変化量として挿入損失差は-1.5dB (減衰変化： $\Delta\alpha/k \approx -690$ ppm) 程度、位相差は-13deg (速度変化： $\Delta V/V \approx -800$ ppm) 程度の減少を示した。これは培養過程における挿入損失差1.2 dB (減衰変化： $\Delta\alpha/k \approx 550$ ppm) 程度、位相差10deg (速度変化： $\Delta V/V \approx 620$ [ppm]) 程度の増加に対して変化量が大きいが、損傷過程においては 過酸化水素が添加されていることにより、液性が変化したことによると考えられる。SHORT.ch では培養過程と同様にほとんど変化を確認できなかった。



図(2)-7. Experimental results of H₂O₂ doping process (OPEN.ch)

Blue plots (●) shows the doping process data, and red plots (■) shows the non-treatment data.

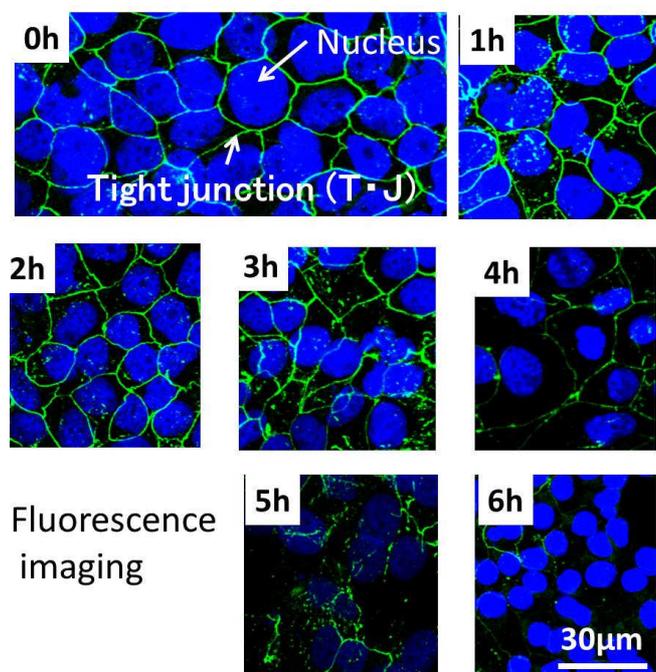
0h indicates the time just after administration of 1mM H₂O₂.

(a) Δ Insertion loss, and (b) Phase shift with time progress.

2) 免疫蛍光染色による細胞損傷の観察

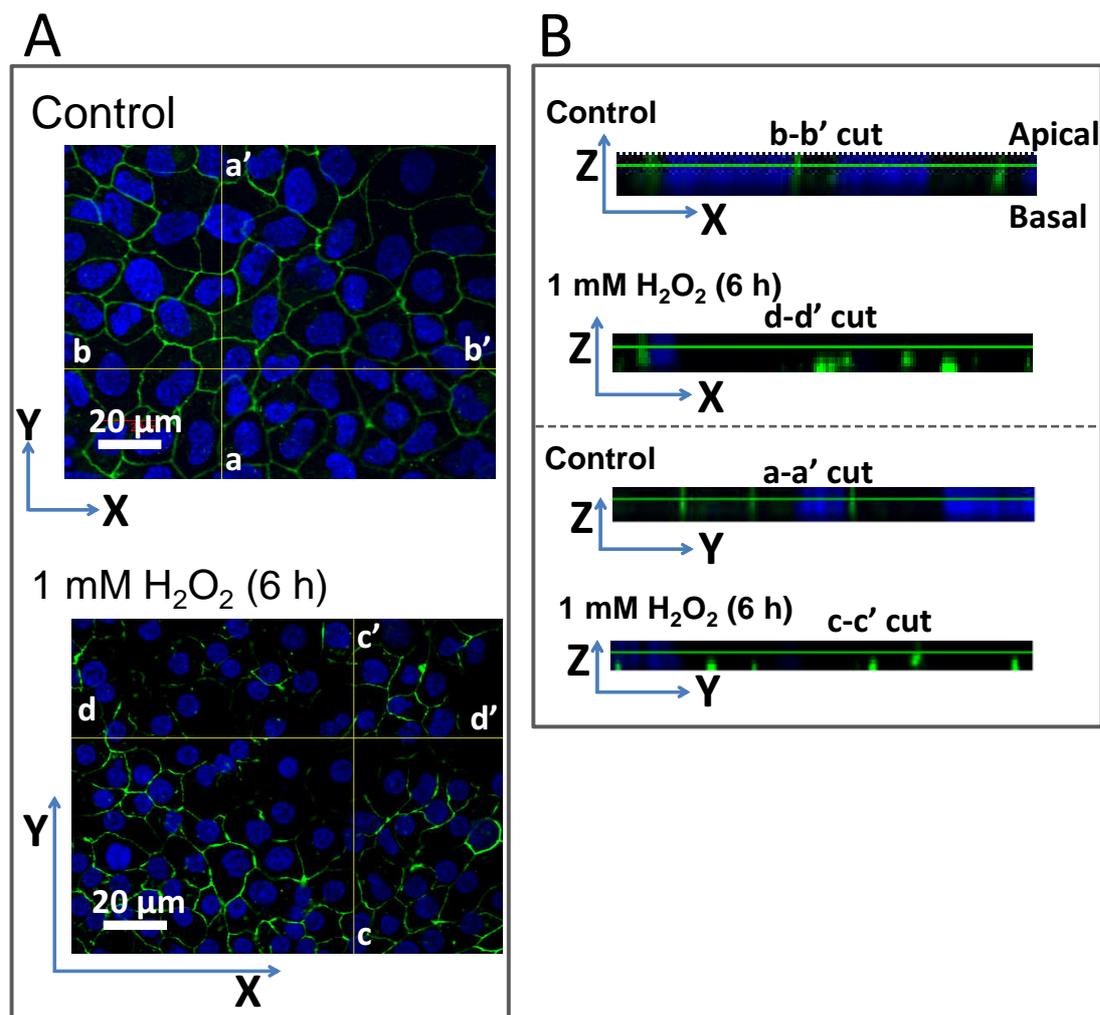
図(2)-8 に過酸化水素投与後、0hから2hごとのSV-40-T2細胞のタイトジャンクションを構成するZO-1タンパクと細胞核を免疫蛍光染色した顕微鏡写真を示す。緑色がZO-1、青色が細胞核である。0hから4hまでの顕微鏡写真ではZO-1の染色は細くなっているが、ZO-1の局在性が崩壊している細胞はほとんど確認されない。それに対して、6hではZO-1の局在性が壊れている細胞が確認でき、4hから6hの間にZO-1の局在性が崩壊すると考えられる。OPEN.chのSH-SAW信号測定結果では、過酸化水素投与後3hから6hにかけて、挿入損失差と位相差が共に最も大きな減衰を示し、ZO-1局在性の崩壊と同調した。ZO-1局在性の崩壊がSH-SAW信号変化に影響を与えたと推測される。

続いて、Z軸方向（細胞表層－基底面方向）におけるZO-1の局在を観察するため、過酸化水素を投与したものと投与しないものそれぞれにZO-1を免疫蛍光染色を施し、共焦点レーザ顕微鏡で観察した。その結果を図(2)-9 に示す。AにX-Y平面の画像を示し、BにX-Z, Y-Z 平面における顕微鏡画像を示す。図(2)-9 (A)によると、コントロール（Non-treatment）と比べ、過酸化水素投与後6hではタイトジャンクションの裏打ちタンパクであるZO-1は崩壊している様子が観察される。この時、細胞の厚さ方向の観察結果が図(2)-9 (B)である。コントロールにおいて細胞のApical（表層）側にあったZO-1 が過酸化水素投与6h経過後にはBasal（基底）側に移動していることが確認できる。ZO-1の崩壊と移動により、細胞の極性維持機能が失われ、細胞の極性が変化し、結果、SH-SAW信号に対して誘電率変化として影響を与えたと推測される。



図(2)-8. Microscope photographs of tight junction architecture in SV40-T2 stained with antibody against ZO-1

Tight junction was disruption by H_2O_2 treatment.



図(2)-9. Microscope photographs of the tight junction stained with anti-ZO-1 (A) X-Y plane. (B) X-Z plane, and Y-Z plane.

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

SH-SAWの信号変化と細胞の形態学的変化との関係性を明らかにし、論文に発表した。すでに、アクチンファイバー構造の分解とそれに伴う細胞-細胞間結合(タイトジャンクション)の崩壊が、SH-SAW信号の変調に重大な関与をしていることを、信号変調成分の詳細な解析によって明らかにした。その為のモデル実験として、パツリンや過酸化水素による細胞骨格の分解と細胞-細胞間結合の崩壊実験を行った。今までは、このような細胞内の物性変化を観察する手段がなかった。従来は、外界からの刺激による細胞死や生化学的変化によって生体影響評価を行ってきたが、新たに異なる測定原理に基づき、細胞内物性変化や細胞-細胞間結合力を計測する手段を得たことで、毒性研究や薬理研究に応用されて行くものと考えている。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境の複合汚染による生体影響を軽微な段階で留めるためには、環境モニタリングによる汚染初期段階での把握と防止が肝要である。今回新たに開発したSH-SAWデバイスを用いたバイオナノ協調体による汚染物質の計測原理によれば、刺激を受けた検出細胞内に引き起こされる軽微な物性変化や外界から異物の侵入を防げ無くなる細胞-細胞間結合の減衰を検出することによって、生体影響物質の存在を明らかにできる。このSH-SAWバイオナノ協調体を微小流体デバイス（本研究(5)を参照）と組み合わせることによって、より簡便かつ安定に、環境試料中に於ける生体影響物質の存在を検出できるものと考えている。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) H. OTORI, T. HIGASHIYAMA, A. UEHARA, M. AINUMA, Y. KUDO, T. KON, K. MOCHITATE, H. KIKUCHI, Y. FURUYA, *Sensors and Actuators A* (2012)
“Signal change of surface acoustic wave (SAW) by H₂O₂ damage to SV40-T2 cells cultivated on SH-SAW Sensor” (in press)

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 上原 篤詞, 貝沼 美帆, 古屋 泰文, 成田 絵里子, 今 大健, 持立 克身：
第4回バイオ・ナノテクフォーラムシンポジウム講演要旨集, 27pp. (2010)
「培養細胞の表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子ナノ・バイオセンサ」
- 2) 上原篤詞, 貝沼美帆, 古屋泰文, 成田絵里子, 今大健, 持立克身：
日本金属学会講演概要, 2010年秋季(第147回)大会, p. 170 (2010),
「培養細胞による表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子バイオセンサ」
- 3) 上原篤詞, 古屋泰文, 貝沼美帆, 今大健, 持立克身：
第20回インテリジェント材料/システムシンポジウム講演要旨集, pp. 10, (2011)
「培養細胞の表面弾性波(SH-SAW)特性変化に着目した環境因子バイオセンサ」
- 4) 大鳥秀貴, 上原篤詞, 貝沼美帆, 工藤優佳子, 東山拓海, 今大健, 持立克身, 菊池英明,
古屋泰文：第21回インテリジェント材料システムシンポジウム (2012)

「表面弾性波(SH-SAW)基板に培養した細胞の損傷による信号変化」

- 5) 東山拓海, 大鳥秀貴, 貝沼美帆, 工藤優佳子, 持立克身, 菊池英明, 古屋泰文:
日本機械学会東北学生会第42回卒業研究発表講演会(2012)
「SAWデバイス基板上のSV40-T2培養細胞の薬液(過酸化水素)損傷に伴う
SH-SAW信号変化」
- 6) H. Otori, A. Uehara, M. Kainuma, Y. Kudo, T. Higashiyama, T. Kon, K. Mochitate,
H. Kikuchi, Y. Furuya: The International Workshop on Piezoelectric Materials
and Applications (IWPMA) 2012 (2012),
“Signal Change of Surface Acoustic Wave (SAW) by H₂O₂ Damage to SV40-T2 Cells
Cultivated on SH-SAW Sensor”
- 7) 東山 拓海, 大鳥 秀貴, 工藤優佳子, 磯野 晶宏, 今 大健, 持立 克身, 菊池 英明,
古屋 泰文: 第22回インテリジェント材料/システムシンポジウム(2013)
「SH-SAW電極間に培養したSV40-T2細胞の薬液損傷モニタリング」

(3) 出願特許

- 1) 特許公開2009-002677 表面弾性波デバイスバイオセンサ、平成19年6月19日

(4) シンポジウム、セミナー等の開催(主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) 池野慎也: “細胞・組織バイオセンシング技術の進展”, BUNSEKI KAGAKU Vol.53, No.3, pp.135-146, 2004.
- 2) T.Nomura, A Saitoh, Y Horikoshi: “Measurement of acoustic properties of liquid using liquid flow SH-SAW sensor system”, Sensors and Actuators B, pp.69-73, 2001.
- 3) 橋本研也: “弾性表面波(SAW)デバイスシミュレーション技術入門”, 株式会社リアライズ社, 1997.
- 4) 吉田武: “改訂 高周波回路設計ノウハウ”, CQ出版, 1992.
- 5) 浅井健吾: “SiO₂/Al/LiTaO₃構造におけるSAW伝搬特性”, 電子情報通信学会総合大会, 2002.
- 6) 独立行政法人国立環境研究所: “バイオナノ協調体による有害化学物質の生体影響の高感度・迅速評価技術の開発”, 平成15年度報告書.

- 7) 独立行政法人国立環境研究所：“人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発に関する研究”、平成23年度報告書。
- 8) Hideki Otori, Takumi Higashiyama, Atsushi Uehara, Miho Kainuma, Yukako Kudo, Toru Kamimura, Tasuku Kon, Katsumi Mochitate, Hideaki Kikuchi, Yasubumi Furuya, Signal change of surface acoustic wave (SAW) caused by H₂O₂ damage to SV40-T2 cells cultivated on SH-SAW sensor, *Sensors and Actuators A: Physical* (in press).
- 9) Takehiro Nitta, Masaki Hata, Shimpei Gotoh, Yoshiteru Seo, Hiroyuki Sasaki, Nobuo Hashimoto, Mikio Furuse, and Shoichiro Tsukita, Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice, *The Journal of Cell Biology*, Volume 161, Number 3, May 12, 2003 653–660.
- 10) J. Miyoshi, Y. Takai, Molecular perspective on tight-junction assembly and epithelial polarity, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 (2005), pp. 815–855.
- 11) 小貝崇, 谷津田博美, 塩川祥子, SH-SAWセンサにおけるSSBWの影響とその補正方法, *Proceeding of Symposium on Ultrasonic Electronics*, Vol. 28, (2007), pp. 143-144 14-16 November, 2007.
- 12) 近藤淳, 塩川祥子, 音響電気相互作用を用いた液相系SH-SAWセンサ, *電子情報通信学会論文誌 C-II*, Vol. J77-C-II, No. 8, pp. 338-347.
- 13) 近藤淳, 弾性表面波デバイスを用いた溶液系センサの開発と識別システムへの応用に関する研究, 静岡大学大学院電子科学研究科電子応用工学専攻博士論文 (1995) [<http://hdl.handle.net/10297/6193>].
- 14) K. Mitsakakis, A. Tsortos, J. Kondoh, E. Gizeli：“Parametric study of SH-SAW device response to various types of surface perturbations”、*Sensors and Actuators B*、pp.408-416、2009.
- 15) D. S. Ballantine, et al, *Acoustic Wave Sensors Theory, Design, and Physico-Chemical Applications*, ACADEMIC PRESS (1997).
- 16) F. Teston, G. Feuillard, L. Tessier, L. P. Tran Hu Hue, and M. Lethiecq, Analysis of the coupling between shear horizontal plate waves and liquids: Application to the measurement of the shear rigidity modulus of glycerol solutions, *J. Appl. Phys.*, Vol. 87, No. 2, 15 January 2000.

(3) SAWバイオナノ協調体の開発に関する研究：SH-SAW デバイス上における上皮組織の構築と組織傷害に伴う信号変調の解析

弘前大学

農学生命科学部 分子生命科学科
理工学部 知能機械工学科

菊池 英明・工藤 優佳子
古屋 泰文

平成21～24年度累計予算額：30,540 千円（うち、平成24年度予算額：5,299 千円）

予算額は、弘前大学（(2), (3)章）としての予算額であり、間接経費を含む。

平成20年度はナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

[要旨]

環境汚染物質による生体影響を検出評価するために、表面弾性波（SH-SAW）デバイス上に上皮組織を構築した。影響評価には、大気汚染物質の代表的標的組織である肺胞上皮から作製した不死化肺胞2型上皮（SV40-T2）細胞を用いた。デバイス上に播種したSV40-T2細胞が、細胞・基質間及び細胞・細胞間結合を形成し、細胞伸展して上皮組織となるに伴って、SH-SAW伝搬波の挿入損出は増大し、到達時間（伝搬速度／位相差）は短縮（増大／増大）した。

次に、SH-SAW バイオナノ協調体を用いて、大気汚染物質による生体影響評価のモデル実験を実施した。試験物質には、酸化ストレスを与える代表的物質として過酸化水素を選択した。培地への1mM 過酸化水素の添加によって、細胞・細胞間結合の一つである密着結合の構成タンパク質 Zonula occludens (ZO-1) の局在性は、添加3～6時間目（以下、遅延相）に掛けて崩壊し、密着結合の機能を示す Transepithelial Electrical Resistance (TER)も激減した。また、この変化に先立ち添加1時間～3時間目（以下、初期相）には、細胞基底面に集積するアクチン線維の分解が始まり、更に遅延相では密着結合を裏打ちするアクチン線維も崩壊した。SV40-T2細胞の傷害と同調するように、SH-SAW伝搬波の挿入損出は、遅延相に入ってから減衰した。他方、SH-SAWの位相差（伝搬速度）は、初期相の時点から二相性に低下した。その結果、SV40-T2細胞は剥離していないにも拘わらず、SH-SAWの伝搬波は細胞播種前の状態に回帰した。

以上の結果から、過酸化水素によるSH-SAWの信号変調は、初期相において細胞内部構造形成に関与するアクチン線維が崩壊して位相差が減少し、次いで遅延相に入ってから密着結合が崩壊して誘電率が変化し、挿入損失の減衰に至ったと推測した。SH-SAW伝搬波の変調を観察することによって、上皮組織の構造的及び機能的傷害が検出できることが示唆された。

[キーワード]

タイトジャンクション、肺胞上皮細胞、過酸化水素

1. はじめに

これまで日本が経験した水銀やカドミウムによる重金属汚染、亜硫酸ガスや窒素酸化物による大気汚染、そして、ダイオキシン等有機塩素化合物による汚染の蔓延、その何れにも共通するのは、被曝量及び生体影響の正確な把握が問題解決にとって必須という点である。環境汚染物質は、単独で健康障害を引き起こすというよりも、複合汚染によることが多く、このような生体影響を検出する計測方法の開発があまりなされてこなかった。

2. 研究開発目的

複合汚染による、ヒトへの環境影響評価を行うことができるように、細胞あるいはそれらの集合体である疑似組織を構築し、その細胞の物性変化を鋭敏に検出するシステムの構築をおこなってきた。具体的には、SH-SAWデバイス上に上皮細胞を生育させ（SH-SAWバイオナノ協調体）、検討する汚染化学物質を培養液に混ぜて微小流路を通すことにより細胞に暴露し、細胞の物性変化をSH-SAWのパラメータ変化と関係付けることにより、環境汚染物質の生体影響を検出するシステムの開発を行った。

3. 研究開発方法

(1) 研究の材料と方法

1) 細胞の培養

実験に用いた細胞は、外界との接触に曝される肺胞上皮細胞株 SV40-T2¹⁾を用いた (A. Clement からの提供)。細胞は、37°CのCO₂インキュベーターで5% fetal bovine serum (FBS)を含んだ Dulbecco's modified Eagle's medium (D'MEM)で培養し、4-5日間隔で継代を行った。化学物質としては、SV40-T2細胞は外界からの様々な化合物との接触により活性酸素分子種による障害が報告されていることから、過酸化水素を用いた。

2) 細胞-細胞間結合力と SAW 信号の関係を調べる方法

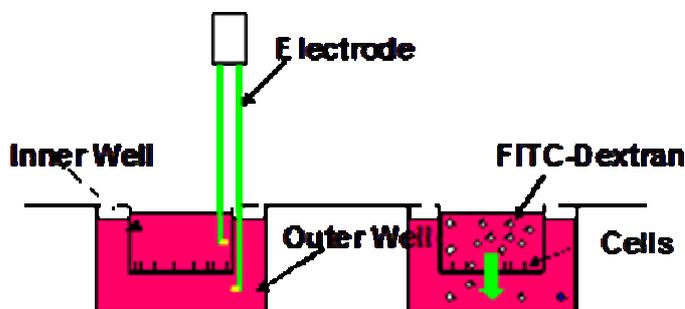
細胞間接着構造を崩壊させるモデルシステムとして、SV40 ウイルスの Large T 抗原を導入して不死化した肺胞上皮細胞を用いた。環境における大気汚染物質に直接晒される組織として、最初に接触する臓器の上皮細胞であるという理由からである。細胞間接着構造は、外界からの様々な侵襲から個体を防御する重要なバリアーとして働いている。環境汚染物質の中には、この細胞間接着機構を破壊する作用をもつ物質が数多く存在している可能性がある。細胞間接着を崩壊させる物質のモデルとして、過酸化水素を用いた。細胞間結合力に関与する結合のうち、タイトジャンクションは過酸化水素により破壊されることは報告されているが、その機構は明らかになっていない。そこで、タイトジャンクションの機能的性質を調べることができる、Transepithelial Electrical Resistance (TER) を計測する方法と、FITC-Dextran 粒子の透過性を検出する方法により、単層肺胞上皮細胞のシートに過酸化水素を作用させた後の経時的変化を、SAW 信号の経時的変化と比較する方法を用いた (図(3)-1)。

a. Transepithelial Electrical Resistance (TER) 測定

12 ウェルプレートにトランスウェル・ポリカーボネート・セルインサート (#665641, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) を乗せ、 1×10^4 /well の密度で細胞をまき、7-14 日培養した。電気抵抗測定器 (Millipore, Millicel-ERS)を用いて、電気抵抗値を測定した²⁾。

b. FITC-Dextran の透過性測定法

SV40-T2 細胞 (P50) を 12 well トランスウェルのインサート (0.4 μ m pore, Greiner bio-one) に 1×10^5 /well の密度でまき、6 日間 D'MEM 培地で培養し、測定日前日にフェノールレッドを含まない D'MEM に培地を交換した。過酸化水素処理後、0, 3, 6, 12, 24, 48 時間後にそれぞれ透過性測定を行った。透過性測定には 4 kDa-FITC (fluorescein isothiocyanate)-Dextran (Sigma Life Science, FD4) を使用した。測定は、フェノールレッドを含まない D'MEM 培地のみであるブランク一連とコントロール、0.5, 1 mM 過酸化水素の各三連で行った。過酸化水素の処理は上面側と基底面側にそれぞれ処理を行った。4kDa-FITC-Dextran をアピカル側に 20 μ l/ml の終濃度になるように加えた。透過性測定は基底面側培地からフェノールレッドを含まない D'MEM を 50 μ l 採取し、それらを Fluoroskan Ascent FL-TKS (Labsystems, Helsinki, Finland) を使用して Ex485nm, Em538nm で測定を行った。



図(3)-1. TER 測定法と FITC-Dextran 透過性測定法

図の左側が TER 測定法であり、右側が FITC-Dextran 透過性測定法の概略図である。Inner well の底面には半透膜が張っており、単層の上皮細胞を生育させることにより、Outer well と Inner well の間にできたバリアーの状態を、電極を用いて抵抗値を測定する (TER)、あるいは outer well に漏れ出てきた FITC の蛍光値を測定する (FITC-Dextran)。

3) 免疫染色

ZO-1 の局在を観察するため、以下の方法で免疫蛍光顕微鏡観察法を行った³⁾。以降の操作は室温で行った。PBS (-)で SV40-T2 細胞を洗浄後、1% ホルムアルデヒド/PBS (-)で 15 分間細胞を固定した。PBS (-)で洗浄後、0.2% Triton X-100/PBS

(-)で15分間膜の透過性を高めた。PBS (-)で洗浄後、1% BSA/PBS (-)に浸した。カバーガラスを別のディッシュに移し、1% BSA/PBS (-)で1:100に希釈した一次抗体 (mouse anti-ZO-1 antibody T8-754、京都大学の月田教授から分与して頂いた) を加え、一時間反応させた。1% BSA/PBS (-)で洗浄後、カバーガラスを別のディッシュに移し、1% BSA/PBS (-)で1:250に希釈した二次抗体 (Molecular Probes™ Alexa Fluor 488 rabbit anti-mouse IgG antibody) を加え、室温で30分間、暗所で反応させた。PBS (-)で洗浄後、 $1.6 \mu\text{g/ml}$ の Hoechst 33258 で15分間、暗所で反応させた。スライドガラスに50% グリセロールを1-2滴滴下し、カバーガラスを細胞付着面が下になるように設置した。グリセロールをキムワイプで軽く吸い取り、乾いたらマニキュアで周りを固めサンプルを作製した。画像の取得は、共焦点レーザー顕微鏡 (FV1000D, Olympus, Tokyo, Japan) によって行った²⁾。

4) デバイス表面の擬似マトリックス・コーティング

基本的には、Furuyama らの方法に従った⁴⁾。擬似マトリックスとしては、主鎖となるポリエチレンにフェニル基が結合したモノマーと、マレイン酸のカルボキシル基を介して、細胞接着リガンドになる合成ペプチド、または糖鎖を化学結合させた化合物を用いた。フィブロネクチン RGD ペプチド (FIB-1)、ラミニン α 1鎖 G4-ペプチド (AG73) を MAST-OH に結合させた各擬似マトリックスを、終濃度 $5 \mu\text{g/ml}$ になるように無血清培地 D'MEM に加え、LiTaO₃ のチップ上に $200 \mu\text{l}$ 載せ、炭酸ガスインキュベータ中 37°C で2時間反応させた。実験に用いる細胞を培地にサスペンドし、擬似マトリックスでコートしたチップ上に載せ、炭酸ガスインキュベータ中 37°C で一晩接着させた。余分な細胞を除き、血清を加えた培地を注いでさらに細胞を生育させ、SAW パラメータを計測する実験に用いた。

5) SH-SAW パラメータの測定

SAW の計測のためのデバイスは、弘前大学理工学部古屋研究室で設計された一方向性浮型電極のタイプとした。SH-SAW の周波数特性は、ネットワークアナライザー (Agilent 社製 E5062A) を用いて測定した。本実験では、バイオセンサーとして SH-SAW 伝搬面に細胞を培養し、細胞層の物性変化による SH-SAW 伝搬特性の変化を検出することが目的であるので、高周波信号が通過する表面成分の伝搬特性における挿入損失 (Insertion loss) と位相 (Phase shift) について測定を行った。

6) 細胞-細胞及び細胞-基底マトリックスとの結合力と SAW 信号の関係を調べる方法

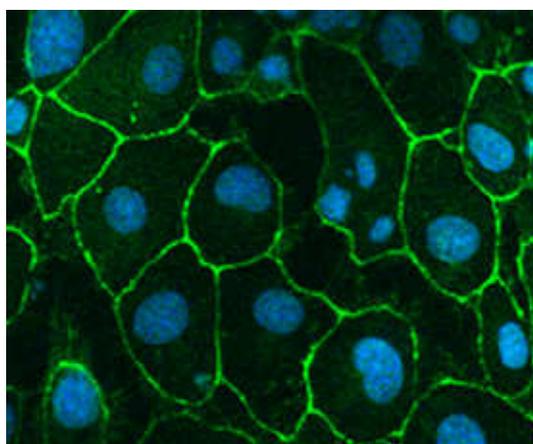
東京電機大学グループの研究開発で作製された、接着に関与する遺伝子を導入した HEK293 細胞を用いて、細胞-細胞間及び細胞-基質間との結合力を調べるための基礎的な方法の開発を行った。HEK293 細胞に、syndecan を安定発現した 293 recombinant (rSN 細胞)、及び、E-cadherin を cloning した発現ベクターを導

入した E-cadherin recombinant、293/E-cad、rSN/E-cad がそれぞれ作製されている（東京電機大学、田中真人グループ）。これらの細胞を SAW デバイス上に生育させ、SAW のシグナルに及ぼす効果から、どのような細胞間結合力が関わっているかを明らかにする方法である。

4. 結果及び考察

(1) バイオセンサーの構築

SH-SAW センサ上に擬似マトリックスを構築し、その上に SV40-T2 細胞を接着、生育させたものを固定し、Zonula occludence-1 (ZO-1) 抗体を用いて免疫染色した結果が **図(3)-2** である。チップ上に細胞が接着し、上皮細胞としての性質であるタイトジャンクションが形成されている様子が ZO-1 の細胞間に線状の明瞭な染色像によって示されている。

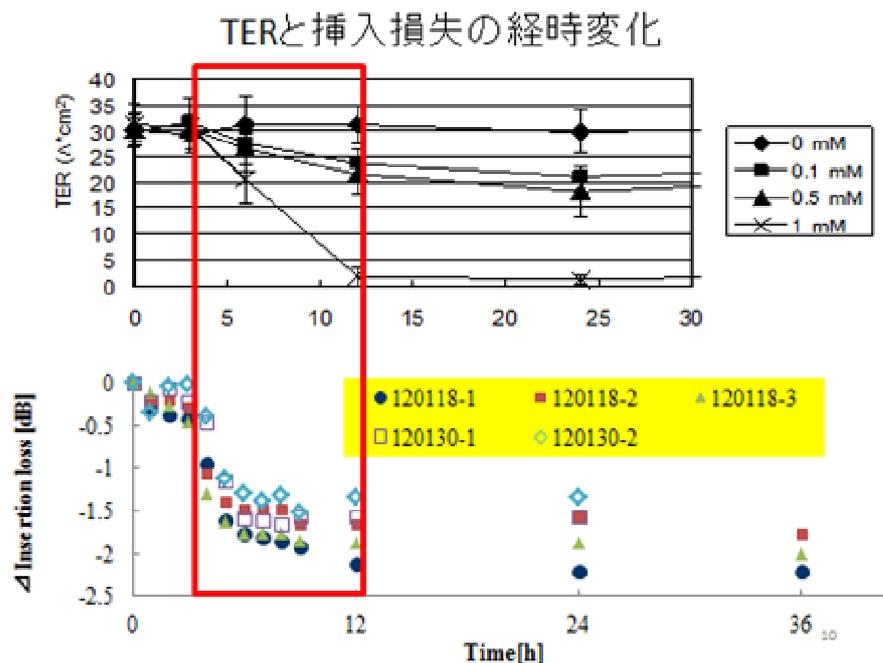


図(3)-2. SV40-T2 細胞の ZO-1 抗体による免疫染色

(2) 過酸化水素が TER と SH-SAW シグナルに及ぼす効果

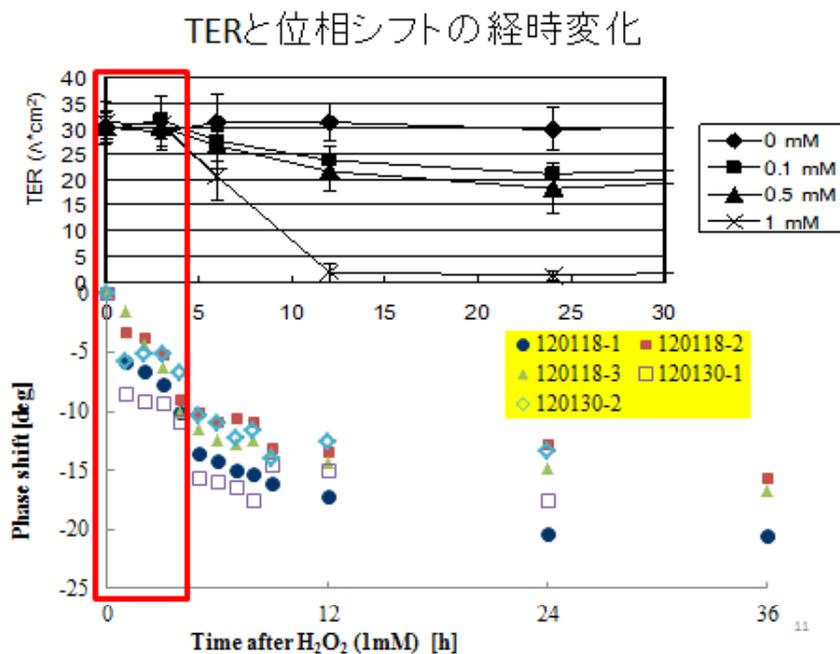
以前の我々の実験から、タイトジャンクションを形成した腸上皮細胞に、マイコトキシンであるパツリンを投与するとタイトジャンクションが崩壊し、細胞間隙を通過してイオンが細胞層の間を自由に流通できるようになり、細胞層の間の抵抗値が減少するいわゆる TER の減少を観測していた²⁾。そこで、肺胞上皮細胞である SV40-T2 細胞を、過酸化水素で処理し、経時的に TER を測定した。また、同じ条件で SH-SAW のパラメータを計測した (**図(3)-3** 及び **図(3)-4**)。

SH-SAW バイオナノ協調体で、培養上皮細胞がデバイス上に生育していくに従って、表面弾性波の位相と挿入損失の増大が観察された(データは示していない)。位相と挿入損失が十分に上昇した時点で、過酸化水素を添加すると、急激に位相と挿入損失の値は減少した (**図(3)-3** 及び **図(3)-4**)。



図(3)-3. TERと挿入損失の経時変化

TERは過酸化水素濃度を0.1, 0.5, 1.0 mMの条件について計測しているが、挿入損失(Δ Insertion loss)は、過酸化水素1.0 mMの条件で独立に5回測定した。



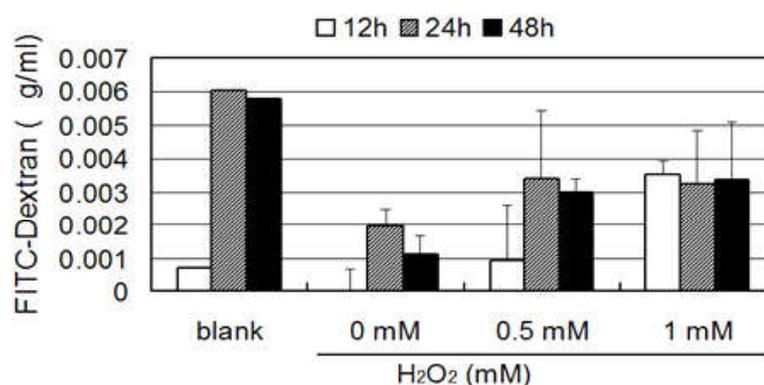
図(3)-4. TERと位相シフトの経時変化

TERは過酸化水素濃度を0.1, 0.5, 1.0 mMの条件について計測しているが、挿入損失(Δ Insertion loss)は、過酸化水素1.0 mMの条件で独立に5回測定した。

しかしながら、挿入損失の減少は過酸化水素処理 3 時間後から急激に低下し、12 時間後には定常状態に落ち着いている。この減少とよく一致して、イオンの透過性増大を示す TER の減少が観察された。この挿入損失の減少は、オープンチャンネルでのみ観察され、ショートチャンネルでは観察されなかった。

一方で、位相変化は図(3)-4 に示すように、過酸化水素を投与した直後から減少を始め、12 時間まで低下し続けていることが明らかとなった。この位相の減少も、オープンチャンネルでのみ観察され、ショートチャンネルでは観察されなかった。

細胞間隙の増大によるイオン透過性の上昇は、しばしば分子量の大きな粒子の透過性の上昇を伴うことが知られている。そこで、分子量 4 kDa のデキストランに FITC を結合させた粒子が通過する量を、培地の蛍光値を測定することで定量した(図(3)-5)。過酸化水素 (0.5 mM, 1 mM) の処理により、下層のチャンバーの培地における FITC の蛍光値が、過酸化水素の濃度依存的に増大していることが観測された。12 時間より早い時間での測定は行っていないが、細胞間の結合が崩壊していることを示唆する結果であった。



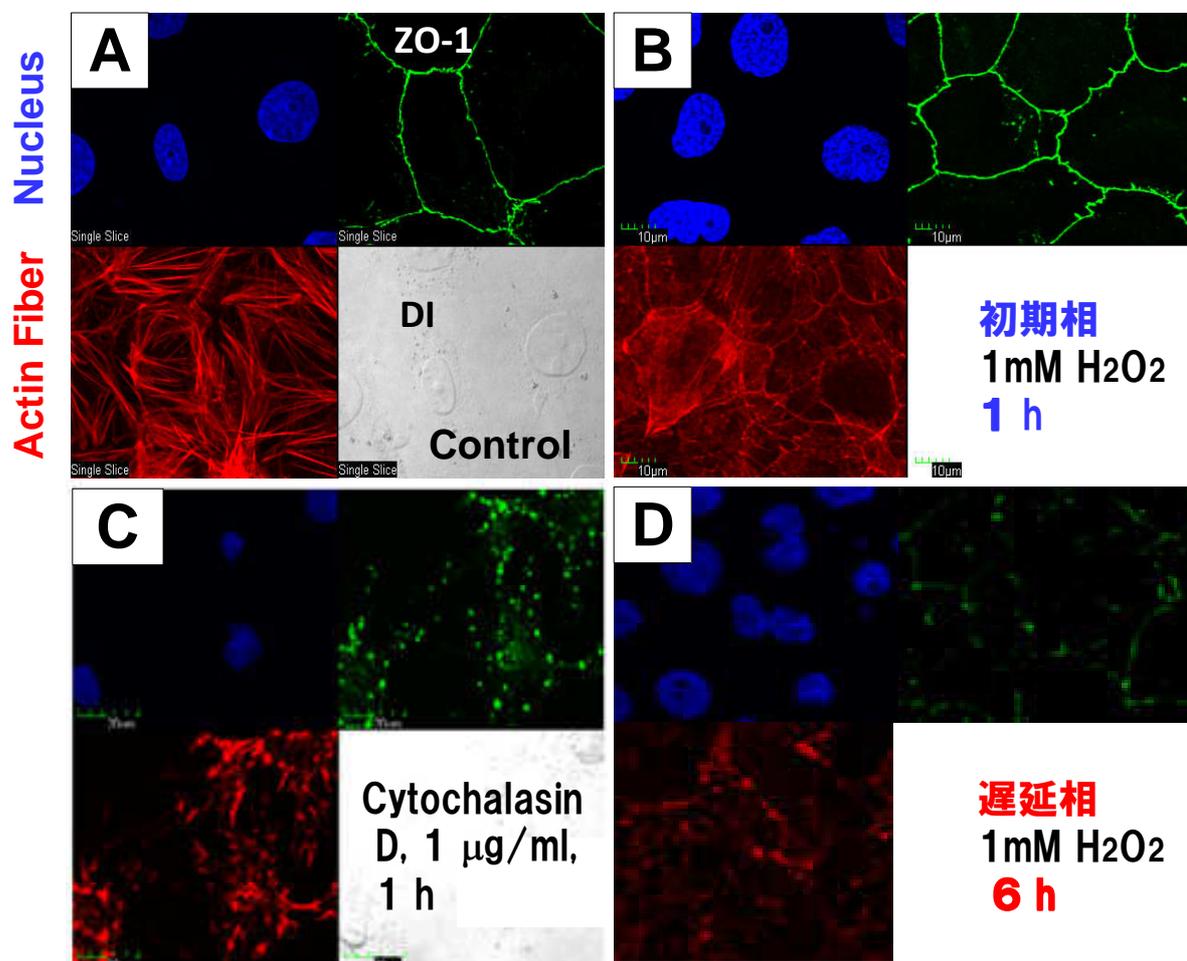
図(3)-5. 酸化水素が FITC-Dextran の透過性に及ぼす効果 (SV40-T2 細胞)

これらの観察結果から、過酸化水素の処理により細胞-細胞間結合が崩壊していると共に、細胞内の何らかの物性変化が、SAW 信号の変化に対応していることが考えられた。以下、3つの可能性に関して実験を行った。

1) 細胞内アクチン線維の崩壊による物性変化

過酸化水素の処理により、細胞内アクチン線維が崩壊することは、すでに他の細胞において報告されている^{5, 6)}。そこで、肺胞上皮細胞である SV40-T2 を、カバーガラス上に蒔き、過酸化水素処理を行い、アクチン線維をファロイジンにより染色した。図(3)-6 に示すように、細胞の基底面に形成されていたアクチン線維(図(3)-6A)は、過酸化水素添加 1 時間後には崩壊した(図(3)-6B)。しかし、細胞-細胞間接着部位のアクチン線維は明確に観察されたことから、ZO-1 の局在を裏打ちしているアクチンは、その結合部位に留まっていることを示している。これを裏

付けるように、ZO-1 染色の蛍光強度は減少しているものの、密着結合は未だ存在していることを示唆している。しかし、添加 6 時間後には、細胞-細胞間接着部位のアクチン線維も分解し、密着結合の崩壊によって ZO-1 の局在性も失われた (図(3)-6D)。

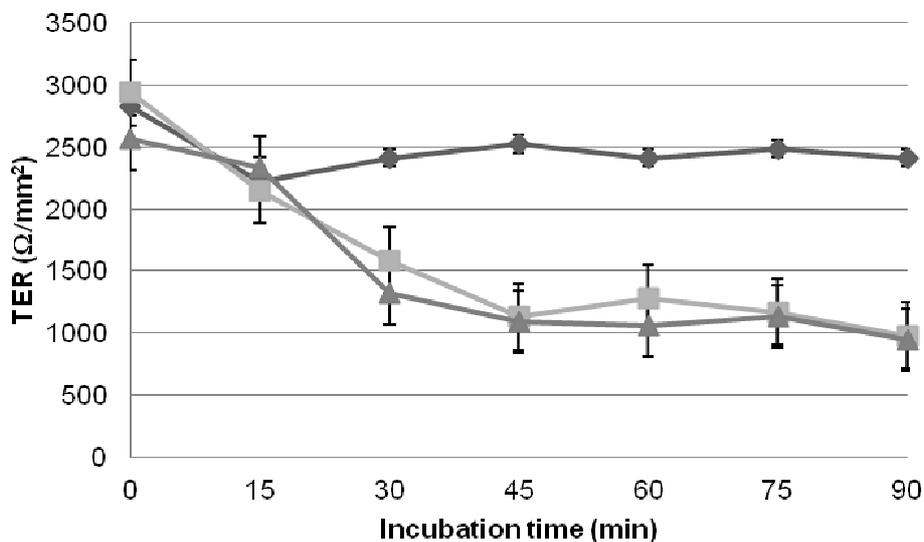


図(3)-6. SV40-T2 細胞のアクチンファイバーと ZO-1 の変化

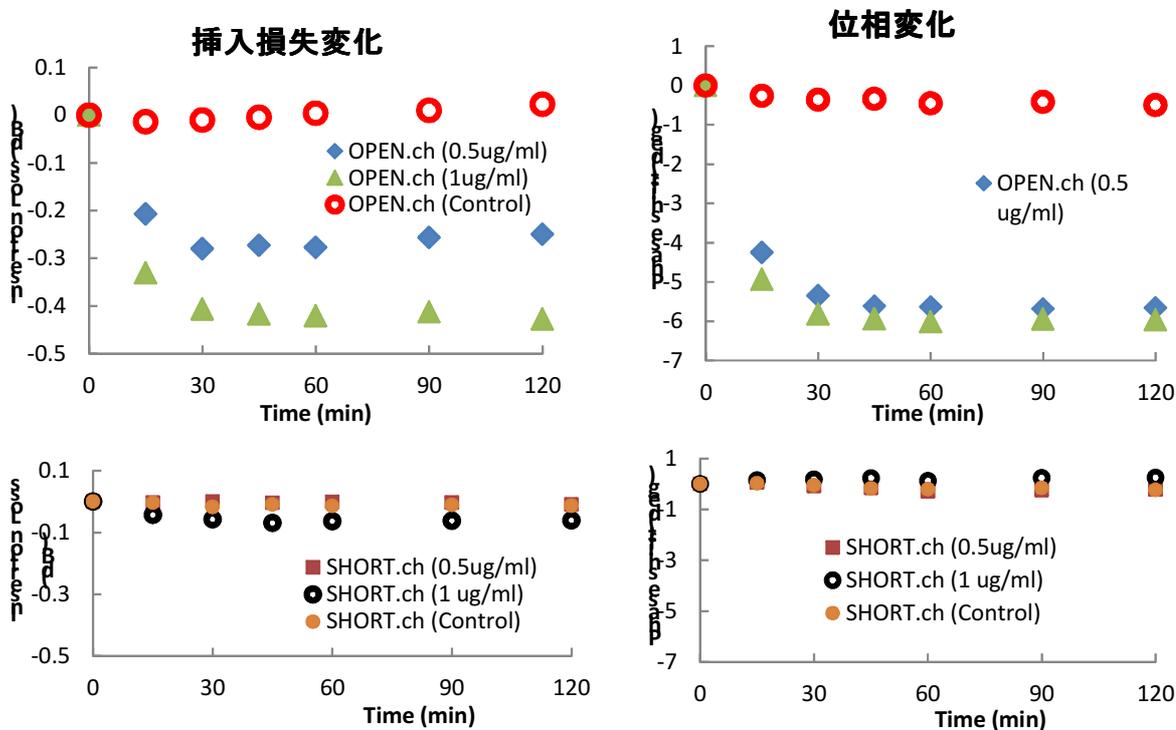
(A) 対照、(B) 1mM H₂O₂ 添加 1 時間後。密着結合(ZO-1)は正常だが、アクチンファイバーの分解は始まっている。(C)、サイトカラシン D 添加 1 時間後。密着結合は崩壊し、アクチンファイバーも分解している。(D)、1mM H₂O₂ 添加 6 時間後。(C)と同様。

細胞内アクチン線維の減少が、細胞間結合を崩壊させることを示すために、アクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン D を用いて、アクチン線維とタイトジャンクションの ZO-1 を染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。図(3)-6C に示すように、0.5 μ M のサイトカラシン D の処理によりアクチン線維は消失し、タイトジャンクションを構成している ZO-1 の染色像は断裂していることを示している。この条件下では、細胞間のイオン透過性を示す TER の値は、サイトカラシン D 処理後速やかに減少していることが観察された (図(3)-7)。また、この条件下での SH-SAW の挿入損失と位相の変化を測定すると、いずれも OPEN チャンネルにお

いてのみ減少していることが明らかとなった（図(3)-8）。



図(3)-7. サイトカラシン D 処理による TER の変化



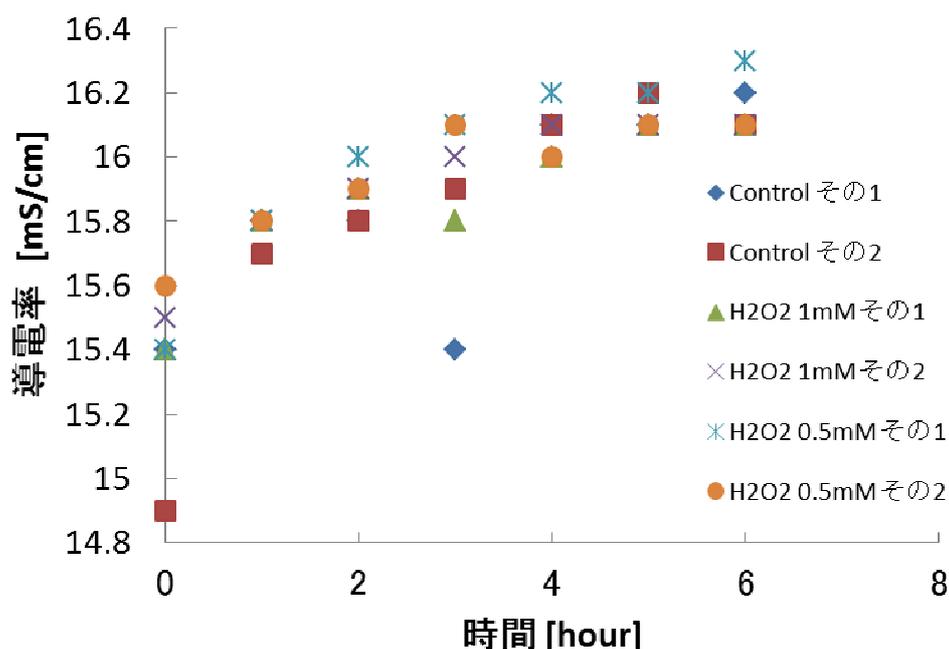
図(3)-8. サイトカラシン D 処理による SH-SAW 挿入損失、位相の変化

さらに、アクチンフィラメントの崩壊と SH-SAW シグナルの位相変化の関係を明らかにするために、アクチンファイバーの脱重合剤であるサイトカラシンDを用いた実験を行った。サイトカラシンD $0.5 \mu\text{g/ml}$ と $1.0 \mu\text{g/ml}$ では、細胞内アクチンファイバーは、ほぼ完全に崩壊している。このとき、位相変化はどちらの濃度でも同じレベルにまで減少していることが観察された (図(3)-8 右上)。その一方で、挿入損失はサイトカラシンDの濃度依存性に、シグナルレベルが減少していることが観察された (図(3)-8 左上)。このことは、SH-SAW の位相変化はアクチンファイバーの崩壊と強く関係した現象であり、挿入損失の変化はタイトジャンクションの崩壊と強く関係した現象であることを示唆している。

細胞内物性の変化が、SH-SAW シグナルの変化に及ぼす要因として、物質の粘弾性⁷⁾、電氣的効果(導電率、誘電率)が報告されている。しかしながら、上記 SH-SAW シグナル変化は OPEN チャンネルで観察されているが、SHORT チャンネルでは変化がないことから、電氣的要因がその変化の主体であることが推定された。

2) 過酸化水素による肺胞上皮細胞損傷に伴う溶媒の導電率の変化

過酸化水素 1 mM は、細胞にとってかなり過酷な条件であり、時間過程に伴って損傷を受け細胞内物質が培地に漏出してくる可能性がある。このことは、SH-SAW 表面の溶媒の導電率が変化する可能性がある。溶媒の導電率の変化も SH-SAW の挿入損失および位相変化に関係していることが報告されている⁸⁾。そのため、過酸化水素処理後の培地における導電率を計測した。時間経過とともに導電率は変化していることが観察されたが (図(3)-9)、対照実験の細胞チャンバーにおいてもほとんど同様な傾向を示した。このことから、SH-SAW の測定は対照電極と過酸化処理電極の差として計測しているため、導電率の変化は SH-SAW のパラメータ変化には影響を与えないと考えられた。しかしながら、SH-SAW が影響を及ぼす基盤表面付近の導電率に関しては、計測することができないため、導電率の変化による SH-SAW シグナル変動の可能性は残されている。



図(3)-9. 細胞培養液中の導電率の変化

過酸化水素（0.5 mM, 1.0 mM）投与後、6時間まで経時的に培養液の導電率を測定した。

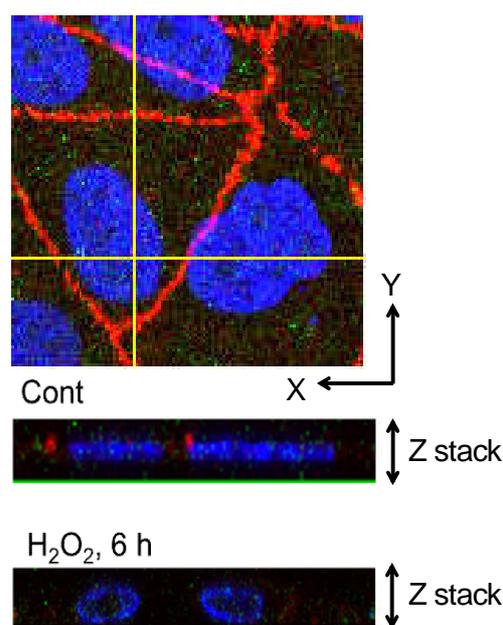
これらのことは、細胞内の構造タンパク質であるアクチンファイバーが崩壊することによって、細胞内流動性が上昇していることを意味していると考えられる。即ち、細胞内の粘弾性の変化の可能性と、細胞内流動性の上昇による細胞極性の変化である。細胞極性の変化は、SH-SAW基盤上に固定された極性の変化、つまり細胞を含めた基盤の比誘電率の変化をもたらす可能性が考えられる。導電率と、比誘電率の変化によって、SH-SAWの挿入損失及び位相の変化を表わす計算式が導き出されている⁸⁾。

3) 肺胞上皮細胞のタイトジャンクション崩壊に伴う細胞表面の極性変化

上皮細胞の過酸化水素処理による、比誘電率の変化の可能性を検討するために、MDCKII細胞に、東北大学生命科学研究科、福田光則教授より分与されたPodocalyxin-Venus発現ベクターを導入し、2日後に過酸化水素処理を2時間行い固定した後、ZO-1抗体で染色して共焦点顕微鏡で観察した。二次抗体は、Alexa Fluor-568共役ヤギ抗マウスIgG抗体を用いた⁹⁾。通常、上皮性細胞の表面に分布しているポドカリキシンは、タイトジャンクションによって隣り合った細胞が強く接着していることによって細胞表面上の移動を制限されている（図(3)-10黄緑色のドット）。従って、細胞が接着している基底面や細胞側面にはポドカリキシンは分布しておらず、管腔側のみを観察される。しかしながら、過酸化水素処理によって、細胞表面の分子の移動を制限していたタイトジャンクションが崩壊すると、ポドカリキシンは細胞膜の流動性により、管腔側だけではなく基底に近い細胞表面にまで拡散していることが観察される（図(3)-10）。また、赤い蛍光で示されるZO-1のタイトジャンクションが、過酸化水素で崩壊し、シグナルの減衰とともに管腔（上

面側)に留まらず全体に赤く光るようになっていく。

膜タンパク質は、膜貫通ドメインを幾つ持っているかによって分類されているが、細胞外ドメインに極性アミノ酸の分布が偏っている場合も考えられる。ポドカリキシンの場合には、シアル酸が付加されているため細胞表面は負に荷電している。従って、タイトジャンクションの崩壊によって細胞表面タンパク質などの分子の自由拡散が可能になれば、上皮細胞として保たれていた細胞極性が変化し、電気的な変化、即ち比誘電率の変化も発生することが考えられる。上記の場合と同様に、SH-SAWの挿入損失及び位相は、比誘電率の変動に伴って変化することが考えられる。



図(3)-10. ポドカリキシンを発現させた MDCKII 細胞の過酸化水素処理

上述のことから、細胞の誘電率の変化が SH-SAW パラメータの変化の大きな要因であることが推定された。しかしながら、現在行っている実験条件や用いている細胞では、SHORT チャンネルでのシグナル変化はほとんど観察されていない(図(3)-8)。このことは、OPEN チャンネルでのみ観察される挿入損失と位相のシグナル変化は、電気的要因によって引き起こされる現象であることが推定される。電気的要因のうち、培地の導電率変化は、対照実験と過酸化水素処理で差が認められないことから、SH-SAW シグナルの変動の要因とはなり難いと考えられる。従って、過酸化水素処理により細胞障害として起こる現象のうち、比較的早い時間に発生する位相変化は、細胞内アクチンフィラメントの崩壊と対応していると考えられる(図(3)-6)。過酸化水素処理から早い時間(0~3時間)では、タイトジャンクションの ZO-1 とそれを支えるアクチン・バンドルはまだ崩壊していない。従って、細胞間接着性の指標である TER はまだ減少を始めていない。おそらく、アクチンフィラメントの崩壊によって、この時期の細胞内流動性は上昇していると考えられ、

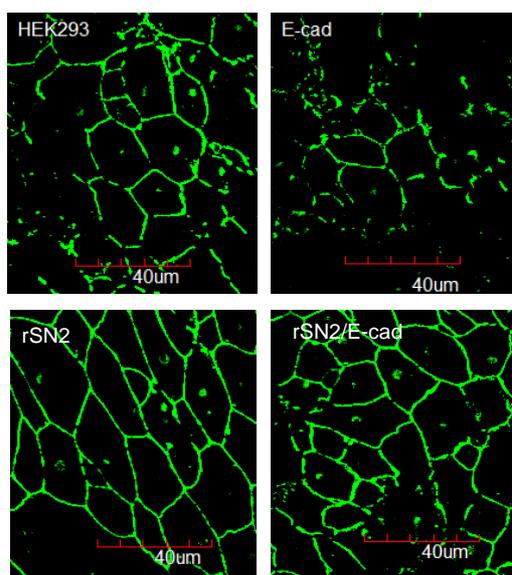
そのために基盤上の細胞の比誘電率が変化したことが原因と考えられる。

過酸化水素処理後、遅い時期（3～6時間）に起こる挿入損失の減少と一致するTERの減少は、細胞間接着機構のタイトジャンクションの崩壊によるものと考えられる。タイトジャンクションの機能の一つに、細胞表面タンパク質の自由な拡散を防ぐバリアーとしての機能がある。従って、タイトジャンクションの崩壊に伴って管腔側／基底面側に局在していたタンパク質が自由拡散を起こし、細胞極性を変化させていると考えられる（**図(3)-10**）。

4) 細胞-細胞間及び細胞-基底マトリックス間の結合力と SAW 信号の関係を調べる方法の開発

細胞間の接着と、SH-SAW 伝搬面への細胞接着の強さが、SH-SAW シグナルの変調に及ぼす機構をより明らかにするために、本研究組織の東京電機大グループによって、接着分子の遺伝子を導入した細胞が作製された。もともと基底面との接着が弱くはがれやすい細胞として、ヒト胎児腎臓上皮細胞である HEK293 細胞を親株として用いた。基底面との接着を強化するために、シンデカンを発現させた細胞株（rSN）、細胞間接着を強化するために、E-カドヘリンを発現させた細胞株（E-cad）、両方を発現させた細胞株（rSN/E-cad）の4種類が準備された。

細胞間結合力に関与するタイトジャンクションの形成が起きているかどうかを明らかにするために、HEK293 細胞の4種類の細胞をカバーガラスに生育させ、タイトジャンクションの構成タンパク質である ZO-1 (Zonula occludens-1) 抗体で免疫染色すると、ほぼ同様のタイトジャンクション特有の局在様式を示す様子が観察された（**図(3)-11**）。



図(3)-11. HEK293 細胞及びその誘導株におけるタイトジャンクションの形成

しかしながら、HEK293 細胞を基盤に生着させた SH-SAW シグナルのデータは不安定で再現性に欠ける結果となった。この原因として、HEK293 細胞では、基盤や金メッキとの接着性がこれまでの擬似マトリックスでは安定した接着が得られないことが考えられた。

今後金メッキとの接着性を向上させた条件を検討することにより、再現的で安定した SH-SAW のシグナルのデータを得ることができると考えており、シグナル変調と細胞内物性変化の関係をより明確にしていくことができると考えられる。また、このことは、iPS 細胞由来の様々な細胞を用いて、様々な臓器に及ぼす環境汚染物質のモニタリングに応用していくためには、その細胞の性質に適合した擬似マトリックスの組成を検討していく必要があることを示している。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

細胞間タイトジャンクションの状態や、細胞骨格を形成しているアクチンファイバーの状態を、非破壊的にリアルタイムで検出する方法は限られており、SAWデバイスによるシグナル変調を検出することにより達成できることを明らかにしてきた。この手法は、今後、環境科学はもとより、毒性学、医薬品開発など広い分野で活用されることが可能な、新しい検出システムであると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

我々のグループは、環境汚染物質により、細胞間のタイトジャンクション及び細胞内のアクチンファイバーが崩壊する状態を、表面弾性波のシグナルの変調から捉えることができることを明らかにした（弘前大学グループ、国立環境研究所グループ）。さらに、SAW基盤上に生育している様々なヒト培養細胞を、微小流路装置に組み込んで長期培養を行うことも完成させている（東京電機大学グループ）。SAWシグナル変調を検出するためのコンパクトな基盤も静岡大学で開発されているので、環境汚染が憂慮される場所に、今後モニタリングポストとして設置することにより、リアルタイムで汚染状況を監視するシステムの構築に活用されることが見込まれる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) M. ISHIDA, T. ITSUKAICHI, D. KOBAYASHI and H. KIKUCHI: *Toxicology* 275, 72-78 (2010)
“Alteration of the PKC- α -Vav1 complex and phosphorylation of Vav1 in TCDD-induced apoptosis in the lymphoblastic T cell line, L-MAT.”
- 2) T. KAWAUCHIYA, R. TAKAHASHI, Y. KUDO, A. TAKAMORI, T. SASAGAWA, K. TAKAHASHI and H. KIKUCHI: *Toxicology Letters*: 205, 196-202 (2011)
“Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells.”
- 3) M. EBINA, M. SHIBAZAKI, K. KUDO, S. KASAI, and H. KIKUCHI: *Biochim. Biophys. Acta*, 1809, 176-183 (2011)
Correlation of Dysfunction of Nonmuscle Myosin IIA with Increased Induction of *Cyp1a1* in Hepa-1 cells.
- 4) S. KASAI, T. ISHIGAKI, R. TAKUMI, T. KAMIMURA, H. KIKUCHI, *Biochim. Biophys. Acta*, General Subjects, 1830, 2509-2516 (2013)
“Beta-catenin signaling induces *CYP1A1* expression by disrupting adherens junctions in Caco-2 human colon carcinoma cells.”
- 5) H. OTORI, T. HIGASHIYAMA, A. UEHARA, M. KAINUMA, Y. KUDO, T. KAMIMURA, T. KON, K. MOCHITATE, H. KIKUCHI, Y. FURUYA, *Sensors and Actuators: A, Physical*
“Signal Change of Surface Acoustic Wave (SAW) Caused by H₂O₂ Damage to SV40-T2 Cells Cultivated on SH-SAW Sensor.” (in press)

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 菊池英明、持立克身、寒地技術論文・報告集、28, 453-455 (2012)
「医薬品・環境汚染物質検出用バイオセンサ デバイス」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 川内谷知子、高森章子、内匠涼、高橋衡平、菊池英明：第33回日本分子生物学会年会（2010）
「カビ毒パツリンによる大腸癌細胞株Caco-2のタイトジャンクション崩壊機構」
- 2) 大鳥秀貴，上原篤詞，貝沼美帆，工藤優佳子，東山拓海，今大健，持立克身，菊池英明，古屋泰文：第21回インテリジェント材料システムシンポジウム(2012)
「表面弾性波(SH-SAW)基板に培養した細胞の損傷による信号変化」
- 3) 東山 拓海，大鳥 秀貴，工藤優佳子，磯野 晶宏，今 大健，持立 克身，菊池 英明，古屋 泰文：SH-SAW 電極間に培養したSV40-T2 細胞の薬液損傷モニタリング，第22回インテリジェント材料／システムシンポジウム（東京），2013年1月8日
- 4) 菊池英明、持立克身、第28回寒地技術シンポジウム(2012)
「医薬品・環境汚染物質検出用バイオセンサデバイス」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Clement A, Steele MP, Brody JS, Riedel N. SV40T-immortalized lung alveolar epithelial cells display post-transcriptional regulation of proliferation-related genes. *Exp Cell Res.* (1991) 196, 198-205.
- 2) Kawauchiya T, Takumi R, Kudo Y, Takamori A, Sasagawa T, Takahashi K, Kikuchi H. Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells. *Toxicol Lett.* (2011) 205, 196-202.
- 3) Itoh M, Nagafuchi A, Moroi S, Tsukita S. Involvement of ZO-1 in cadherin-based cell adhesion through its direct binding to alpha catenin and actin filaments. *J. Cell Biol.* (1997) 138, 181-92.
- 4) Furuyama A, Kimata K, Mochitate K. Assembly of basement membrane in vitro by cooperation between alveolar epithelial cells and pulmonary fibroblasts. *Cell Struct Funct.* (1997) 22, 603-14.
- 5) Boardman KC, Aryal AM, Miller WM, Waters CM. Actin re-distribution in response to hydrogen peroxide in airway epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* (2004) 199, 57-66.
- 6) Chan HL, Chou HC, Duran M, Gruenewald J, Waterfield MD, Ridley A, Timms JF. Major role of epidermal growth factor receptor and Src kinases in promoting oxidative stress-dependent loss of adhesion and apoptosis in epithelial cells. *J Biol Chem.* (2010) 285, 4307-18.
- 7) Mitsakakis K, Tsortos A, Kondoh J, Gizeli E, Parametric study of SH-SAW device response to various types of surface perturbations. *Sensors and Actuators B: Chemical.* (2009) 138, 408-416
- 8) 近藤 淳, 塩川祥子, 音響電気相互作用を用いた液相系 SH-SAW センサ. *電子情報通信学会論文誌*(1994) 8, 338-347.
- 9) Yasuda T, Saegusa C, Kamakura S, Sumimoto H, Fukuda M. Rab27 effector Slp2-a transports the apical signaling molecule podocalyxin to the apical surface of MDCK II cells and regulates claudin-2 expression. *Mol. Biol. Cell.* (2012) 23, 3229-39.

(4) 環境影響評価細胞の開発：細胞間接着因子E-カドヘリンの発現を強化したヒト細胞培養株の樹立

東京電機大学

理工学部 生命理工学系

(独) 国立環境研究所

環境健康研究センター

田中 真人・小泉 良仁

中村 宣篤 (研究協力)

平成21～24年度累計予算額：23,676千円（うち、平成24年度予算額：4,071千円）

予算額は、東京電機大学大学（(4)、(5)章）としての予算額であり、間接経費を含む。

平成20年度はナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

[要旨]

ヒトへの健康影響を評価するバイオナノ協調体のセンサ開発に必要とされる、SH-SAWデバイスへの細胞接着性と細胞-細胞間接着性を強化した細胞株の作成を目的として、ヒトE-カドヘリンcDNAを過剰発現する細胞株の樹立を行った。そのため、E-カドヘリンのcDNAを肝臓のcDNAからクローニングし、発現プラスミド、pCMV-hCDH1を構築した。このプラスミドの配列を精査し、見出された変異部位は、部位特異的変異導入法によって修復した。

安定発現株を得るためには、細胞への遺伝子導入後、プラスミドにコードされた抗生剤耐性遺伝子を使って、細胞を選抜する必要がある。SH-SAWデバイスに播種する影響評価細胞として、培養基質への接着性を高めるためシンデカン遺伝子（rSN細胞）やラミニン-10遺伝子（rLN10細胞）を安定発現株が既に用意されており、幾つかの耐性遺伝子が既に細胞選抜に使われている。本研究では、未選択のピューロマイシン耐性遺伝子有する発現プラスミド（pBApo-CMV Pur）を、安定発現株の選抜に用いた。前記2細胞はHEK293細胞を親細胞とするが、この細胞はE-カドヘリンを発現しているため、導入したE-カドヘリンcDNAと区別できるように、E-カドヘリンのC末端側に6残基のヒスチジンオリゴペプチドを融合したE-カドヘリン発現プラスミドも同時に構築した。

用意した発現プラスミドを、リン酸カルシウム法によってHEK293細胞、rSN細胞、及び、rLN10細胞に遺伝子導入し、ピューロマイシンを培地添加して安定発現細胞株を選抜し、細胞株を樹立した。

[キーワード]

E-カドヘリン、細胞-細胞間結合、293細胞、hSN細胞、rLN10細胞

1. はじめに

環境中には、人類が作り出した多くの化学物質が放出され、さらに多くの物質が新たに製造・使用されていることから、これらの化学物質の安全性を迅速に評価することが重要な課題となっている。化学物質の代表的な生体への影響評価方法として、当核物質で曝露した生体組織や

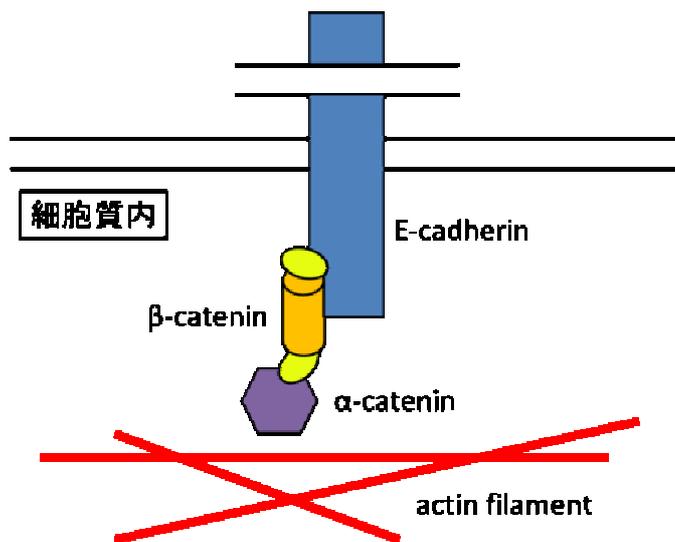
細胞を採取・破碎し、標的成分を抽出・分離・分析する方法があるが、膨大な時間と多くの高額な装置を必要とする。本プロジェクトでは人工組織ナノバイオ複合体を用いた健康影響評価システムの開発を行い、ヒトの健康に及ぼす環境化学物質の毒性評価システムを構築することを最終目標としている。具体的には、表面弾性波 (SH-SAW) センサ上で生体影響を受ける上皮細胞を播種・培養し、細胞の基底面に沿って伝搬するSH-SAWの信号が、環境化学物質によるストレスによって生じた組織傷害で、伝搬波の挿入損出や速度・位相の変調を検出することを利用して、影響評価する方法を開発している。このバイオナノ協調体を、持ち運び可能な微小流体チップに組み込めば、実用可能な環境計測センサとして利用できるようになる。まずは、大気汚染物質によって傷害を受ける肺胞上皮組織由来の不死化肺胞2型上皮 (SV40-T2) 細胞を用いて、影響評価試験が行われている。

2. 研究開発目的

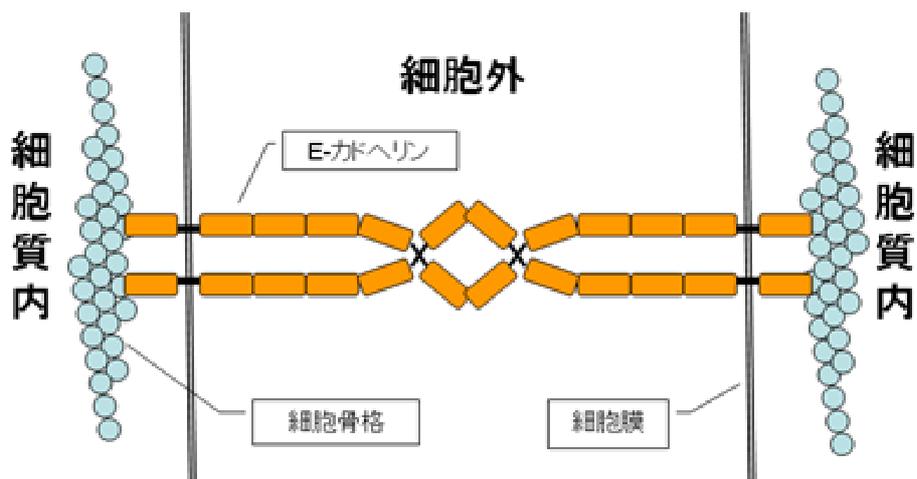
将来的には、このセンサ上に種々のヒト細胞を使用することによって種々のヒト組織に対する生体影響が計測可能となる。当面はそのモデルとして、ヒトの株化上皮細胞をセンサ上で安定に保持でき、長期培養が可能な遺伝子導入株を樹立する必要がある。既に、細胞外マトリックスと結合するヒトシンデカンを安定発現する細胞株 (hSN)、細胞外マトリックス成分であるヒトラミン-10を安定発現する細胞株 (rLN10) を樹立している。hSN細胞、rLN10細胞は、ヒト腎臓由来のHEK293細胞を親細胞として遺伝子導入され確立した細胞株である。本研究では、同種の細胞間接着に関わるヒトE-カドヘリンcDNAを含むプラスミドを、これらの細胞株に遺伝子導入することによって、E-カドヘリンを安定発現する細胞株を作製し、得られた細胞株がSH-SAWバイオナノ協調体に対する搭載細胞として、生体影響計測原理の解明や影響評価細胞として役立つか検討に用いる。

E-カドヘリンは、上皮細胞膜表面で発現する分子量120 kDaの糖タンパク質である。カドヘリンは細胞同士の接着を司っており、カルシウム依存性 (calcium-dependent) 細胞接着 (cell adhesion) タンパク質であることがカドヘリンの名の由来になっている¹⁻⁴⁾。カドヘリン結合は同種親和的な結合に分類される。E-カドヘリンは、細胞外に5つのドメインを持ち、先端のドメイン (EC1) が結合部位となる⁵⁾。またE-カドヘリンは細胞質内で細胞骨格であるアクチンフィラメントと結合し (図(4)-1)⁶⁾、接着結合及びデスモソーム結合を担っている⁷⁾。なお、細胞外にN末端側が配向し、細胞質内にC末端側が配向する⁵⁾。結合様式としては、同じ細胞膜状のE-カドヘリン同士が2量体となった後、隣り合う細胞膜上のE-カドヘリン2量体と結合する (図(4)-2)⁵⁾。

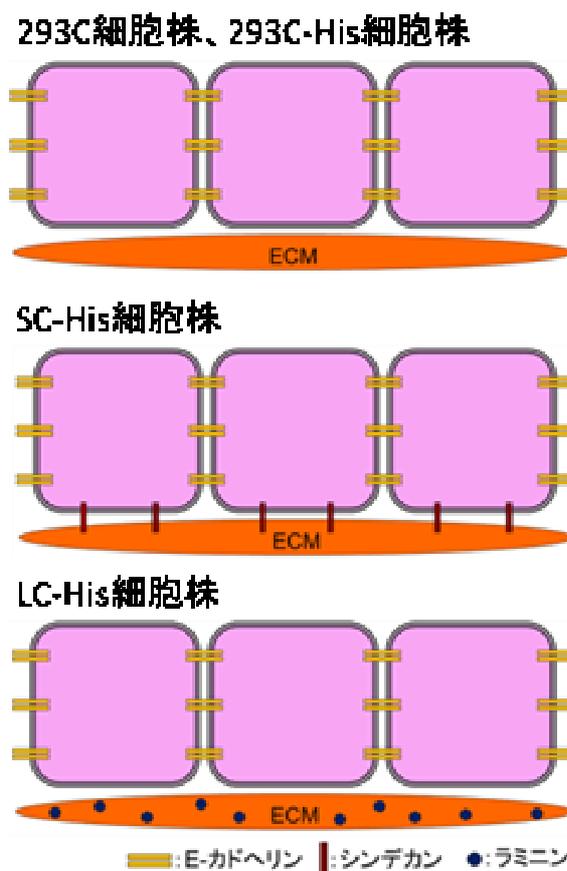
E-カドヘリンは上記のように120 kDaの比較的大きな分子であるので、遺伝子導入の際に用いるE-カドヘリンcDNAには塩基の置換や欠失、付加などが起こりやすいことが予想されたので、遺伝子リソースからの導入ではなく、自ら分子クローニングすることとした。計画した安定発現細胞株の想定する性質と名称を図(4)-3に示した。



図(4)-1. E-カドヘリンと細胞骨格との結合



図(4)-2. E-カドヘリン二量体を介した細胞間の結合



図(4)-3. 安定発現株の名称と想定する性質

3. 研究開発方法

(1) E-カドヘリン発現プラスミドの構築

1) pCMV-hCDH1 の構築

E-カドヘリンのcDNAはヒト肝臓のcDNAライブラリーを鋳型として、PCRクローニングによって得た。用いたプライマーはSP-Ecad、5'-GGCCATGGGCCCTTGAG-3'およびASP-Ecad、5'-GACTCGAGCTAGTCGTCCTCGCCG-3'であり、PCR反応後、*NcoI*および*XhoI*で切断し、pCMV-oligo ベクターに挿入した。挿入配列全長の塩基配列の結果、メチオニンのコードATGから数えて23番目の塩基がTからCへ、2138番目のTがCへ変異していることが判明したので、部位特異的変異挿入法によって、両者の塩基をCに戻したプラスミドを作製した。それぞれの当該部位を含む制限酵素断片を調製し、元のプラスミドに埋め戻した。再度、全長の配列分析を行って塩基配列を確認した。このプラスミドはサイトメガロウイルスの下流にE-カドヘリンcDNAが結合しているため、上皮系の細胞を含む多くの細胞で一過的発現に用いることができる。哺乳動物細胞での選択マーカーを同一プラスミド上には有していない。

2) pBApoK2-hEcadおよび pBApoK2-hEcad-MCSの構築

pCMV-hCDH1を鋳型として、PCRプライマーであるSP-Xba1-hCDH1、5'-CCTCTA

GACACCATGGGCCCTTGGAG-3' および ASP-MCS-hCDH1、5'- CCAAGCTTAAACT CGAGAAGATCTGTGTCCTCGCCGCC-3'を用いてPCR反応後、*Xba*Iおよび*Hind*IIIで切断してPCR増幅断片を得た。予め、pBApo-CMV Purベクターを*Pci*Iおよび*Xho*Iの制限酵素認識配列を切断-埋め戻し法で破壊したベクターをpBApoK2とした。このベクターを*Xba*Iおよび*Hind*IIIで切断して、上記のE-カドヘリンcDNA-MCS断片を挿入した。PCR法による塩基変異を避けるため、pCMV-hCDH1からPstI-PciI断片を単離し、入れ替えを行った。また、pBApoK2-hEcad-MCSの*Kpn*I-*Xho*I部位にpCMV-hCDH1の*Kpn*I-*Xho*I断片を挿入することでpBApoK2-hEcadを構築した。このプラスミドはサイトメガロウイルスの下流にE-カドヘリンcDNAが結合しており、同一プラスミド内に哺乳動物細胞での選択マーカー、ピューロマイシン耐性遺伝子を有する。マルチクローニング部位 (*Bgl* II, *Xho* I, *Hind* III) を供えているので、容易にC末端側にペプチドの挿入が可能である。ただし、余分なペプチド (RSSRV) がつながっているため、pCMV-hCDH1から得た*Kpn* I-*Xho* I断片をpBApoK2-hEcad-MCSの*Kpn* I、*Xho* I部位に挿入する手法で、本来の構造のE-カドヘリンをコードするpBApoK2-hEcadも対照として構築した。

3) pBApoK2-hEcad-MCS (6-His) の構築

標記プラスミドはpBApoK2-hEcad-MCS のマルチクローニング部位、*Bgl* II, *Xho* Iに二重鎖合成オリゴヌクレオチドを挿入することで構築した。用いたオリゴヌクレオチドはSP-*Bgl*2-6His-TAA-no*Xho*1、5'-GATCTCATCATCACCATCACCATTAAG-3' および ASP-*Bgl*2-6His-TAA-no*Xho*1、5'-TCGACTTAATGGTGATGGTGATGATGA-3'で、徐々に温度を上げることで二重鎖形成を行った。この二重鎖オリゴヌクレオチドを上記の制限酵素部位に挿入した。このプラスミドはE-カドヘリンのC末端側に6残基からなるヒスチジンペプチドを含むので、抗ヒスチジンペプチド抗体を使って検出できる他、ニッケル-キレックスカラムで単離することも可能である。

なお、以上のすべての発現プラスミドは、塩化セシウム密度勾配遠心法によって、超らせん型のを大量調製し、無菌的に1mM EDTA を含む10mM Tris-HCl, pH7.5 緩衝液に透析して保存した。また、これらのプラスミドのE-カドヘリン・コード領域については塩基配列の決定によってすべて確認済みである。以上のプラスミドが発現するE-カドヘリンの構造の概略を図(4)-4 に示した。



図(4)-4. 各プラスミドで発現するE-カドヘリンの構造

(2) ヒトE-カドヘリンを発現する安定発現株の単離

1) リン酸カルシウム法による単離方法

E-カドヘリンの安定発現株の取得はリン酸カルシウム法による遺伝子導入法によった。用いた細胞はヒト上皮株細胞 293細胞およびその遺伝子導入細胞のhSN細胞、rLN10細胞である。これらの細胞の培養は、T-25フラスコを用い、10%牛胎児血清およびペニシリン、ストレプトマイシンを含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 中で、10%CO₂、37.0℃、飽和水蒸気下の条件で行った。遺伝子導入する前日の夜に、翌朝、細胞の培養密度がフラスコに対して40%~50%までの面積比となるように継代し、細胞の密度が適切であるフラスコを選択し、培地交換 (DMEM) 後3時間培養を継続した。クリーンベンチ内で、2M CaCl₂ 31μLにDNA (pBApoK2-hCDH1 or pBApoK2-hCDH1-RS6His) を5μg加え、250μLまで滅菌水でフィルアップした。その溶液をあらかじめ用意した2×HBS 250μLに攪拌しながら無菌的に混合し、DNA・リン酸カルシウム複合体の沈澱を生成させた。15分間放置して沈澱を安定化した後、DNA・リン酸カルシウム複合体懸濁液を培養中のT-25 フラスコに全量滴下し、4時間培養した。培養後、無血清のDMEMで3回洗浄し、15%・glycerol/HBSを1.5mL滴下し、1分30秒放置した。再度、無血清のDMEMで2回洗浄し、3回目は血清を含むDMEMに交換した。48時間培養後、100mmシャーレ7枚に継代した。翌日、1μg/mL ピューロマイシン入りDMEMに培地交換した。5日に1回程度を目安に、ピューロマイシンを含むDMEMで培地交換を行った。ピューロマイシン耐性の細胞コロニーが半径3mm程度に成長するのを確認して、ペニシリンキャップ法でそれぞれのコロニーを単離し、独立に増殖培養を行った。

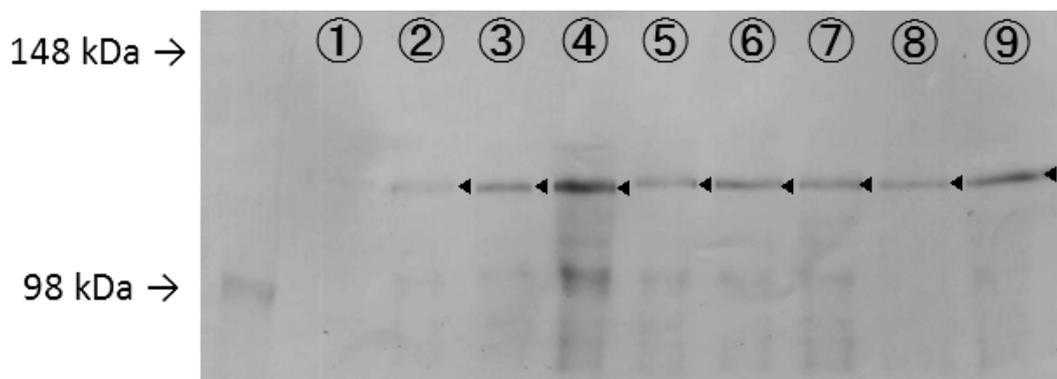
2) 遺伝子導入株の選抜方法と再クローニング

各遺伝子を導入した細胞は、増殖の過程でE-カドヘリンの発現をウェウスタン・ブロティン法によってスクリーニングした。35mmシャーレにコンフルエントになった時点で試料を採取し、SDS・ポリアクリルアミド電気泳動を行った後、ニトロセルロース膜に転写し、抗ヒト・E-カドヘリン抗体または抗ヒスチジン抗体によって可視化し、E-カドヘリンを発現している細胞株を選抜した。図(4)-5 及び (4)-6 にウェウスタン・ブロティン法を行った結果を示した。遺伝子導入によって作製した細胞株で120kDa付近にE-カドヘリンと考えられるバンドを確認した。選抜したクローンの各遺伝子と細胞の組み合わせで、独立に得られた陽性細胞20種ほどの中から高発現と思われる3種の遺伝子導入細胞株を液体窒素温度で保存した。各遺伝子導入株のリストを表(4)-1 にまとめた。この中の細胞株のいくつかについては、性質の異なる細胞株の混入が疑われたので、コロニー形成を再び行って、再クローニングを行った。細胞の名称にRを含むものは再クローニングを経たものであることを示す。



図(4)-5. 抗His抗体を用いたWB法による遺伝子導入細胞株のヒト・E-カドヘリンの検出

① : 分子量マーカー、② : 293-Pur+-1、③ : hSN細胞、④ : rLN10細胞、
 ⑤ : 負対照、⑥ : 293C-His-21、⑦ : SC-His-11、⑧ : SC-His-42、⑨ : SC-His-51、
 ⑩ : LC-His-61、⑪ : LC-His-63、⑫ : LC-His-52



図(4)-6. 抗カドヘリン抗体を用いたWB法による遺伝子導入細胞株の選抜

① : 293細胞、② : 293C-51、③ : 293C-54、④ : 293C-62、⑤ : 293C-His-11、
 ⑥ : SC-His-11 ⑦ : SC-His-11R2、⑧ : LC-His-63、⑨ : LC-His-63R1

	WB法による E-カドヘリンの 発現	PCR法による 断片の増幅	E-カドヘリンの染色
293C-51	○	増幅を確認	E-カドヘリンを染色した
293C-54	○	未	未
293C-62	◎	未	未
293C-His-11	◎	増幅を確認	E-カドヘリンを染色した
293C-His-21	○	増幅を確認	E-カドヘリンを染色した
SC-His-11	○	増幅を確認	E-カドヘリンを染色した
SC-His-11R2	◎	未	E-カドヘリンを染色した
SC-His-11R3	◎	未	未
SC-His-42	△	未	未
SC-His-51	△	未	未
LC-His-52	○	増幅を確認	E-カドヘリンを染色した
LC-His-61	○	未	未
LC-His-63	○	未	E-カドヘリンを染色した
LC-His-63R1	◎	未	E-カドヘリンを染色した

表(4)-1. 作製した E-カドヘリン安定発現株

◎：濃いバンドを確認、○：バンドを確認、△：薄いバンドを確認

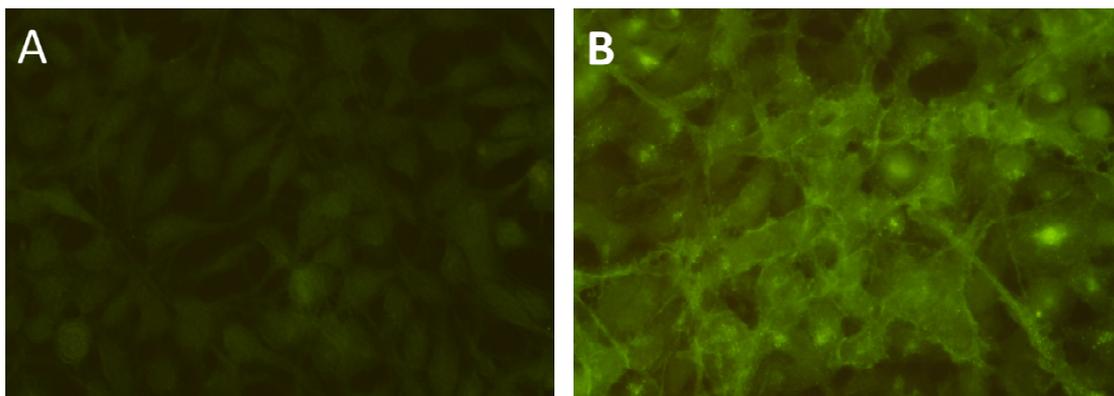
未：未検定

4. 結果及び考察

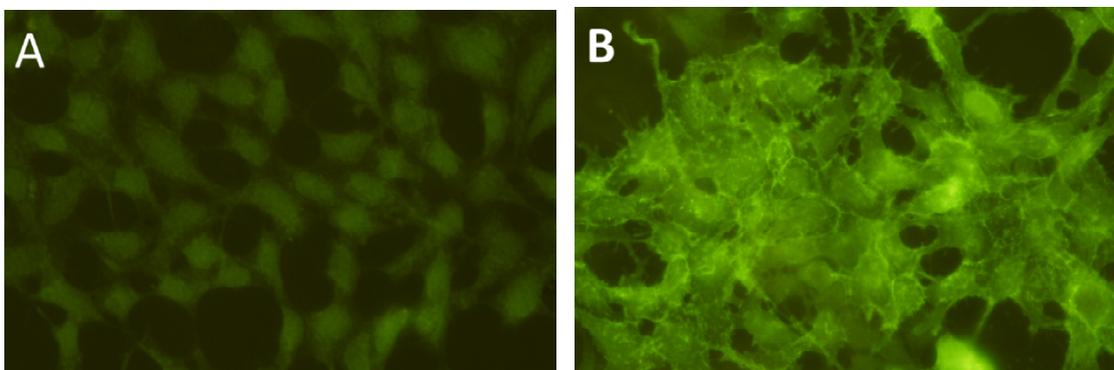
(1) ヒトE-カドヘリンを発現する安定発現株の性質

1) ヒトE-カドヘリンの細胞内局在

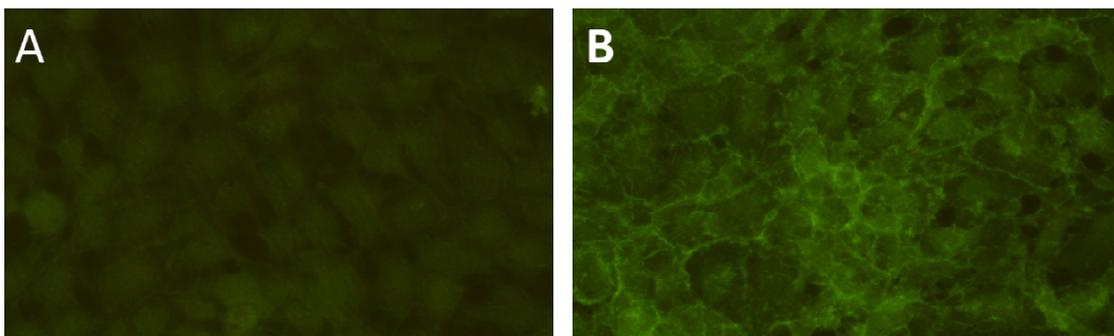
各遺伝子導入株について、カバーガラス培養後、免疫組織染色を行い、ヒトE-カドヘリンの細胞内局在および細胞骨格マイクロフィラメントの構造への影響を調べた。図(4)-7～(4)-10に示すように、293C-51、293C-His-11、293C-His-21、SC-His-11、SC-His-11R2、LC-His-52、LC-His-63、LC-His-63R1細胞株では、遺伝子導入前の細胞株に比べ、細胞膜付近でのE-カドヘリンの発現・局在が明確に示された。C末端に6残基のヒスチジンペプチドが付加したE-カドヘリンを発現する293C-His-11細胞株と、C末端に6残基のヒスチジンペプチドが付加しないE-カドヘリンを発現する293C-51細胞株はアクチンフィラメントも同時に染色したが、293C-51細胞株でアクチンフィラメントの細胞膜付近での局在がみられた。SC-His-11R2とLC-His-63R1は再クローニングした細胞株である。再クローニング前の細胞株と比較して、強力かつ均一な細胞膜付近でのE-カドヘリンの発現・局在を確認した。E-カドヘリン発現プラスミドであるpBApoK2-hCDH1-RS6His及びpBApoK2-hCDH1の遺伝子導入によって、293細胞が本来合成している量の数倍以上のE-カドヘリンを発現し、なおかつ細胞膜に局在していることが明らかになった。またC末端に6残基のヒスチジンペプチドが付加してもE-カドヘリンは細胞膜に局在することが確かめられた。したがって、6残基のヒスチジンペプチドが付加したE-カドヘリン安定発現株をこれからの研究に利用できると考える。



図(4)-7. E-カドヘリンの細胞内局在(1)
A : 293細胞、B : 293C-His-21



図(4)-8. E-カドヘリンの細胞内局在(2)
A : hSN細胞、B : SC-His-11

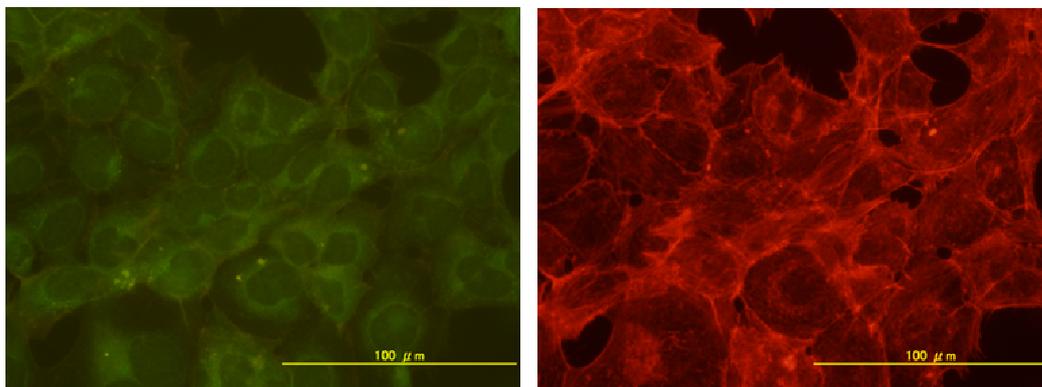


図(4)-9. E-カドヘリンの細胞内局在(3)
A : rLN10細胞、B : LC-His-52

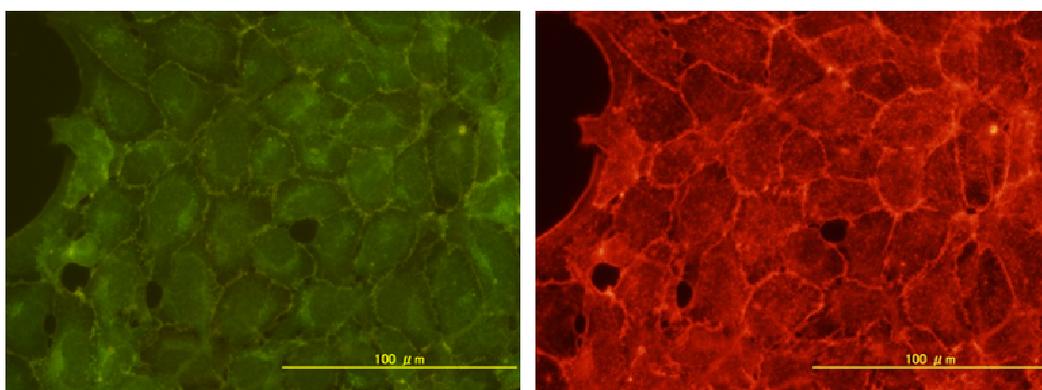
2) E-カドヘリンの細胞内局在とミクロフィラメントの構造との相関関係

本研究では、E-カドヘリンとアクチンフィラメントが結合することで表面弾性波がより伝わりやすくなると予想し、E-カドヘリンの安定発現株を作製した。しかし293細胞では少量の内在性E-カドヘリンを発現している。そこで内在性のE-カドヘリンと区別するために、C末

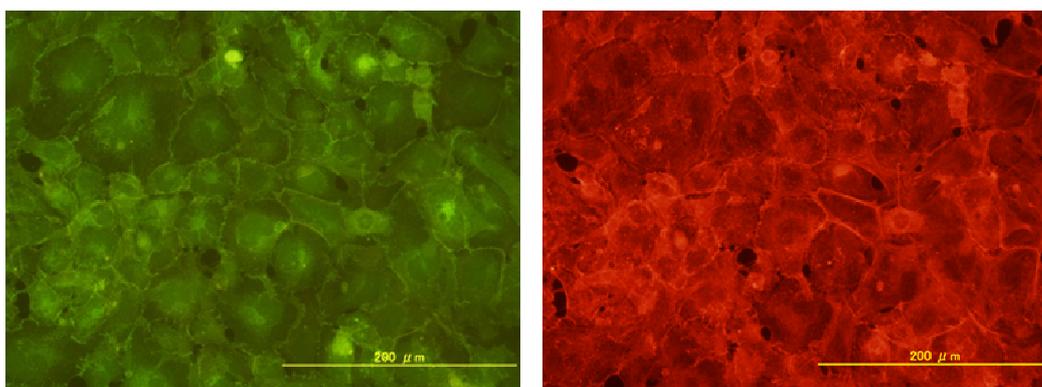
293細胞



293C-51細胞



293C-His-11細胞



図(4)-10. E-カドヘリンとアクチンフィラメントの細胞内局在

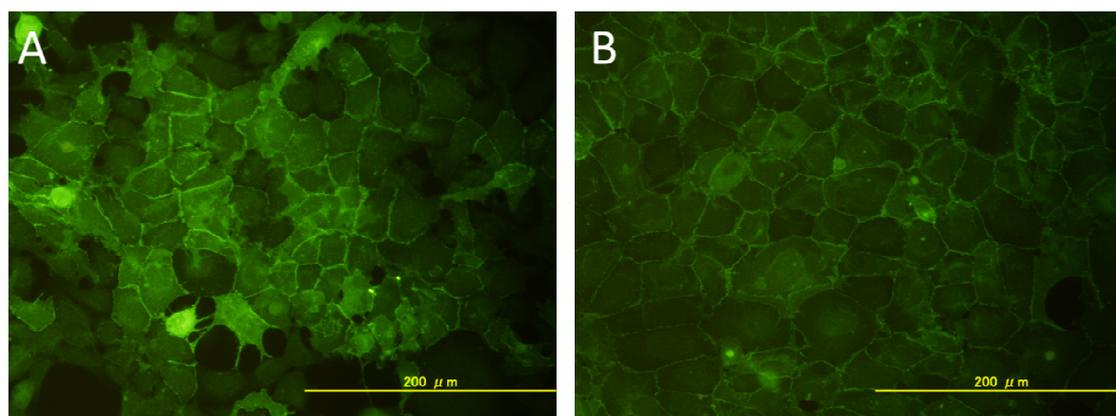
4%パラホルムアルデヒドを含むD-PBS(-)で15分間固定した細胞を洗浄し、0.2%トリトンX-100を含むD-PBS(-)で処理した細胞をウサギ抗カドヘリン抗体で反応し、洗浄後ビオチン標識抗ウサギIgG抗体で処理し、FITC-ストレプトアビジンで可視化した。アクチンフィラメントを染めるために、1 μ g/mLになるようにローダミンファロイジンを用いた。

端に6残基のヒスチジンペプチドを付加する必要があった。そこで、E-カドヘリンとアクチンフィラメントの結合が6残基のヒスチジンペプチドによって阻害されていないかを調べるために、6残基のヒスチジンペプチドを付加しないヒトE-カドヘリンを安定発現株の作製も行った。293細胞株と293C-His-11細胞株に比べて、293-51細胞株でアクチンフィラメントが細胞膜付近に局在している(図(4)-10)。C末端近傍のドメインはカテニン分子を介してアクチンフィラメントとの相互作用を行っており、6残基のヒスチジンペプチドがアクチンフィラメントとE-カドヘリンの結合に何らかの影響を及ぼす可能性が考えられる。E-カドヘリンとアクチンフィラメントの結合には、 β -カテニンと α -カテニンの介在が必要であるが、E-カドヘリンの過剰発現のみで、E-カドヘリンとアクチンフィラメントの結合が誘起されることが示唆された。hSN細胞やrLN10細胞でも6×Hisを付加しないE-カドヘリン安定発現株を作製すべきだと考える。

3) 今後の課題と展望

今回、樹立した様々な細胞株は、環境健康モニターとして、実用研究で試験されることを期待するが、E-カドヘリンは同種の細胞同士の自己集合に関わる分子として機能していることが推測されている。今回、再クローニングの過程で、コロニーごとにE-カドヘリンの発現量が異なっているケースが多々見られた。この性質が、再クローニングを容易にしているものと思われた。実際、再クローニング前の細胞株に比べて再クローニング後の細胞株ではよりE-カドヘリンが均一に局在し強く発現している(図(4)-11、(4)-12)。この性質は今後培養センサに用いる細胞を作製してゆくとときにうまく利用できるように思われた。

今回、遺伝子導入したプラスミドが染色体のどの位置に取り込まれて発現しているのかは現状では、解析終了してはいないが、いずれのケースにおいてもサイトメガロウイルスのプロモータの下流にあることは確認済みである。



図(4)-11. 再クローニングすることによるE-カドヘリンの細胞内局在化の変化
A : SC-His-11、B : SC-His-11R2

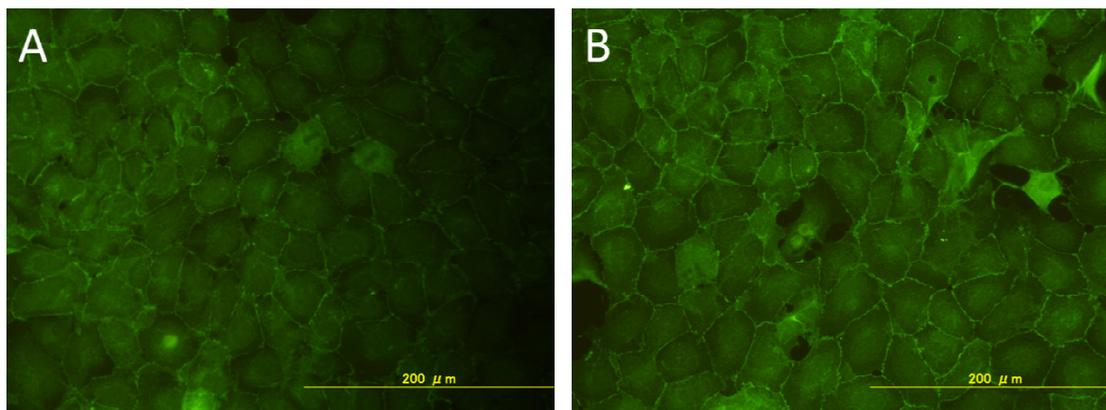


図12. 再クローニングすることによるE-カドヘリンの細胞内局在化の変化
A : LC-His-63、B : LC-His-63R1

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

pCMV-hCDH1、pBApoK2-hCDH1、pBApoK2-hCDH1-MCS、pBApoK2-hCDH1-RS6His計4種類のヒトE-カドヘリン発現プラスミドを得た。これらのプラスミドは、配列が確定しているため、今後も様々な研究利用できる研究資源となった。E-カドヘリンのC末端部分には制限酵素部位が複数設けてあり、いつでも挿入変異が可能となっている。したがって、ヒトE-カドヘリンの接着部位やC末端を改変し、今後の目的に沿ったヒトE-カドヘリン発現プラスミドの構築が容易である。加えてpBApoK2シリーズはピューロマイシン耐性遺伝子をコードしているため、さらなる安定発現株の作製にも応用できる。

強力にヒトE-カドヘリンを安定発現する細胞株の樹立に成功した。現在ほぼ完成の域に達したSAWセンサに実装して、E-カドヘリンの安定発現によって表面弾性波の速度に差異が生じるか検証できると考える。また東京電機大学二井グループが行う微小流体チップ内への実装も同時に検証していきたい。

(2) 環境政策への貢献

バイオナノ協調体による計測の主眼は、従来の抗体や酵素を用いた抗体型や酵素型バイオセンサの様に、単に特定物質の計測を行うのではなく、環境汚染物質や環境化学物質が生体に与える影響を「細胞や組織に対する機能的・構造的変化」として計測できることにある。今回開発した細胞は、バイオナノ協調体の環境影響評価細胞に利用できる。

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

特に記載すべき事項はない。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) 村原中, 脇田晃充, 三宅裕, 立石昇一朗, 平山貴浩, アズラン・アズヒム, 村松和明, 田中真人, 遠藤修, 宮崎幸造, 松尾洋孝, 四ノ宮成祥, 守本祐司 (2011) 「脱細胞化血管スキャフォールドを用いた細胞培養用リングモジュールの開発」 *生体医工学*, **49** 巻 3 号 508-515 (2011)
- 2) Azran, A., Ueno, A., Tanaka, M., Akutagawa, M. and Kinouchi, Y. (2011) "Evaluation of Blood Flow Velocity Envelope in Common Carotid Artery for reference data." *Biomedical Signal Processing and Control-Elsevier Journal*, **6**, 209-215.

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) Kawashima, H., Goto, Y., Saitoh, D., Nemoto, W., Tanaka, M. (2012). Unusual post-translational modification of GFP derivative. 2012 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, held in San Francisco, U.S.A. Dec.15-19, 2012.
- 2) 川島 洋明, 後藤 優佳, 林 千慧, 根本 航, 田中 真人(2012). ペプチド性の翻訳後修飾基を介したカルネキシンまたはカルレティキュリンとの複合体形成. Binding ability between a novel peptide modifier on the BraC protein and calnexin or calreticulin. 第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場、福岡、2012 年 12 月 14 日～16 日
- 3) 川島 洋明, 清水 絵里子, 齋藤 大地, 田中 真人(2012). カルネキシンは N 型糖鎖のないヒト血液凝固第 X 因子と複合体を形成する. Calnexin binds to the human coagulation factor X without N-glycan. 第 85 回日本生化学会大会、福岡国際会議場、福岡、2012 年 12 月 14 日～16 日
- 4) 川島洋明、木下綾野、石井佐織、渋谷温、山崎太郎、雨宮伸、田中真人(2012) 遺伝性球状赤血球症の赤血球膜糖タンパク質、バンド 3 の膜内外の安定性に関する解析、第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会、パシフコ横浜、横浜 (2012 年 11 月 30 日・12 月 2 日)
- 5) 石井佐織、渋谷温、山崎太郎、雨宮伸、子川和広、木下綾野、川島洋明、田中真人(2012) 共焦点顕微鏡による先天性溶血性貧血の赤血球膜タンパク質、バンド 3 の膜内配向解析、第 115 回日本小児科学会学術集会、福岡国際会議場、福岡県、2012 年 4 月 20 日 (金)～22 日 (日)
- 6) 渋谷温、川島洋明、山崎太郎、石井佐織、三浦信之、南陸彦、田中真人(2011) 遺伝性球状赤血球症の一家族における赤血球膜糖タンパク質、バンド 3 の安定性解析. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会、前橋、群馬、2011 年 11 月 25 日 (金)～27 日 (日)

- 7) 小野樹, 守本祐司, 田中真人, 古川克子, 牛田多加志, Azran Azhim (2011) 脱細胞化した半月板の組織学的解析および生体耐久性の評価に関する研究. 生体医工学シンポジウム 2011, 2-4-3, 長野, 2011 年 9 月
- 8) Azhim, A. Yamagami, K. Muramatsu, K. Morimoto, Y. and Tanaka, M. (2011). The Use of Sonication Treatment to Completely Decellularize Blood Arteries: a Pilot Study,” *Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc. 2012*, 2468-2471. (査読付き) (33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '11) held in Boston, USA. Aug.30-Sep.3 2011)
- 9) 高橋哲也, アズラン・アズヒム, 村松和明, 守本祐司, 田中真人 (2011) ウシ半月板組織の脱細胞化に及ぼす超音波と生物化学的処理の組み合わせ効果. 第 50 回日本生体医工学会, P3-5-1, 東京, 2011 年 5 月
- 10) 山上和樹, アズラン・アズヒム, 高橋哲也, 長島良祐, 村松和明, 守本祐司, 田中真人 (2011) 超音波照射の効果による豚大動脈の脱細胞化. 第 50 回日本生体医工学会, P1-1-8, 東京, 2011 年 4 月
- 11) 高橋哲也, アズラン アズヒム, 山上和樹, 長島良祐, 村松和明, 守本祐司, 田中真人 (2011) 脱細胞化したウシ半月板足場で培養したウサギ半月板細胞の特性評価. 第 10 回日本再生医療学会総会, 2P-120, 270, 新宿, 2011 年 3 月
- 12) 川島 洋明, 鈴木 もも子, 星野 卓哉, 菊池 康弘, 藤原 恵理, 高橋 春菜, 田中 真人, N 型糖鎖を含まないヒト血液凝固第 II 因子とレクチン型シャペロンとの結合、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、2010 年 12 月 10 日 (金)
- 13) 藤森悠、幡多 徳彦 田中 真人, 福井 康裕, 舟久保 昭夫 (2010) 細胞挙動変化を用いたヒト肝ガン細胞の定量的機能評価に関する研究. 第 48 回日本人工臓器学会、仙台、2010 (平成 22) 年 11 月 18 日 (木) ~20 日 (土)
- 14) Azhim, A., Takahashi, T., Muramatsu, K., Morimoto, Y. and Tanaka, M. (2010). “Decellularization of Meniscal Tissue Using Ultrasound Chemical Process for Tissue-Engineered Scaffold Applications,” WCB 2010, IFMBE Proceedings, vol. 31, pp. 915–918, Springer. (査読付き) (In 6th World Congress on Biomechanics held at Singapore, 1-6 August, 2010.)
- 15) Azhim, A., Narita, Y., Muramatsu, K., Morimoto, Y. and Tanaka, M. (2010). “Decellularization of Living Tissue Using Microwave Chemical Process for Tissue-Engineered Scaffold Applications,” WCB 2010, IFMBE Proceedings, vol. 31, pp. 934–937, Springer, 2010. (査読付き) (In 6th World Congress on Biomechanics held at Singapore, 1 - 6 August 2010.)

(3) 出願特許

アズラン・アズヒム、田中真人、村松和明、峰崎進、遠藤修 (2009) 「生体組織の処理方法」特願2009-192608

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Takano, A., Tanaka, M. and Futai, N. (2012). On-chip CO₂ incubation for pocket-sized microfluidic cell culture. *Microfluid. Nanofluidics*. **12**, 907–915.
- 2) Furuyama A, and Mochitate K. (2000). Assembly of the exogenous extracellular matrix during basement membrane formation by alveolar epithelial cells in vitro. *J. Cell Sci.* **113**, 859-868.
- 3) Furuyama A, Hosokawa T, and Mochitate K. (2008). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha have opposite effects on fibroblasts and epithelial cells during basement membrane formation. *Matrix Biol.*, **27**,429-440.
- 4) Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. **251**,1451-1455.
- 5) Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell–cell junctions *Histochem, Cell Biol*, **130**, 1- 20.
- 6) Smith, A.L., Dohn, M.R., Brown, M.V. and Reynolds, A. B. (2012). Association of Rho-associated protein kinase 1 with E-cadherin complexes is mediated by p120-catenin. *Mol. Biol. Cell*. **23**, 99-110.
- 7) Haussinger, D., Ahrens, T., Aberle, T., Engel, J., and Grzesiek, S. (2004). Proteolytic E-cadherin activation followed by solution NMR and X-ray crystallography. *EMBO J.* **23**, 1699- 1708.
- 8) Pertz, O., Bozic, D., Koch, A. W., Fauser, C., Brancaccio, A. and Engel, J. (1999). A new crystal structure, Ca²⁺ dependence and mutational analysis reveal molecular details of E-cadherin homoassociation. *EMBO J.* **18**, 1738- 1747.
- 9) Maniatis, T., Sambrook, J. and Fritsch, E. F. (1982). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.
- 10) Kingston, R.E., Chen, C.A., and Okayama, H. (2003). Calcium phosphate transfection. *Curr. Protoc. Cell Biol.* Chapter 20, Unit 20.3. Wiley, Hoboken, NJ.
- 11) Towbin, H. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 4350-4354.
- 12) Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-685.

8. 参考資料

A: プラスミドの構築に用いた合成オリゴヌクレオチドの配列

- SP-Ecad : GGCCATGGGCCCTTGGAG
- ASP-Ecad : GACTCGAGCTAGTCGTCCTCGCCG
- pCMV-F : AATGTCGTAACAACCTCC
- S-hEcad475 : CCTCCCATCAGCTGCCC
- S-hEcad1075 : GCAACAGCTGTGATCAC
- S-hEcad1577 : GGAGAGACACTGCCAAC
- S-hEcad2175 : GCTGCTCTTGCTGTTTC
- SV2-R3 : TCAGTTCCATAGGTTGG
- AS-hEcad554 : TGTGCCTTCCTACAGAC
- AS-hEcad1154 : AAGTCCTCGGACACTTC
- AS-hEcad1854 : CCTCCTGGGTGAATTCG
- AS-hEcad2454 : TCCTTTGTCGACCGGTG
- S-hEcad11 : GGAGCCGCAGCCTCTCGGCGCTGCTG
- AS-Ecad11 : CAGCAGCGCCGAGAGGCTGCGGCTCC
- S-hEcad2122 : CCTGCCATTCTGGGGATTCTTGGAGGAATTCTTG
- AS-Ecad2122 : CAAGAATTCCTCCAAGAATCCCCAGAATGGCAGG
- SP-Xba1-hCDH1 : CCTCTAGACACCATGGGCCCTTGGAG
- ASP-MCS-hCDH1 : CCAAGCTTAAACTCGAGAAGATCTGTCGTCCTCGCCGCC
- SP-Bgl2-6His-TAA-noXho1 : GATCTCATCATCACCATCACCATTAAG
- ASP-Bgl2-6His-TAA-noXho1 : TCGACTTAATGGTGATGGTGATGATGA
- pBApo-R : CCTTCCGGTATTGTCTCC

B: pBApoK2-hCDH1の塩基配列

新たに構築したpBApoK2-hCDH1の配列を以下に示す。

【pBApoK2-hCDH1の塩基配列】

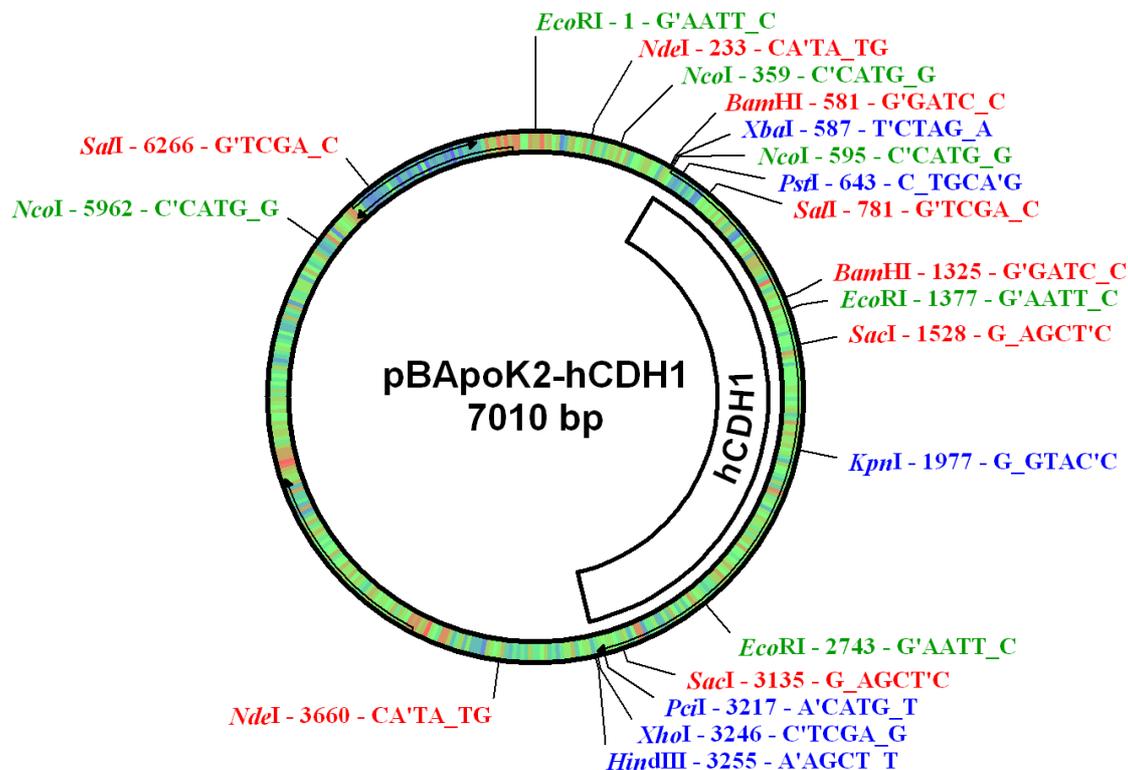
GAATTCTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATA
 ACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACG
 TATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAAC
 TGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
 AATGGCCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTAC
 GTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGT
 TTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACCAAAAT
 CAACGGGACTTTCAAAATGTGCGTAACAACCTCCGCCCATTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC
 GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGGATCCTCTAGACACCATGGGCCCTTGG
AGCCGCAGCCTCTCGGCGCTGCTGCTGCTGCAGGTCTCCTTTGGCTCTGCCAGGAGCCGGAGC

CCTGCCACCCCTGGCTTTGACGCCGAGAGCTACACGTTACGGTGCCCCGGCGCCACCTGGAGAGAGG
CCGCGTCCTGGGCAGAGTGAATTTTGAAGATTGCACCGGTGCACAAAGGACAGCCTATTTTTCCCTC
GACACCCGATTCAAAGTGGGCACAGATGGTGTGATTACAGTCAAAGGCCTCTACGGTTTCATAACC
CACAGATCCATTTCTTGGTCTACGCCTGGGACTCCACCTACAGAAAAGTTTTCCACCAAAGTCACGCTG
AATACAGTGGGGCACCACCACCGCCCCCGCCCCATCAGGCCTCCGTTTCTGGAATCCAAGCAGAAT
TGCTCACATTTCCCAACTCCTCTCCTGGCCTCAGAAGACAGAAGAGAGACTGGGTTATTCCTCCCATC
AGCTGCCCAGAAAATGAAAAAGGCCATTTCCTAAAAACCTGGTTCAGATCAAATCCAACAAAGACA
AAGAAGGCAAGGTTTTCTACAGCATCACTGGCCAAGGAGCTGACACACCCCCTGTTGGTGTCTTTAT
TATTGAAAGAGAAAACAGGATGGCTGAAGGTGACAGAGCCTCTGGATAGAGAACGCATTGCCACATAC
ACTCTCTTCTCTCACGCTGTGTCAACCGGAATGCAGTTGAGGATCCAATGGAGATTTTGATCAC
GGTAACCGATCAGAATGACAACAAGCCGAATTCACCCAGGAGGTCTTTAAGGGGTCTGTCATGGAA
GGTGCTCTTCCAGGAACCTCTGTGATGGAGGTACAGCCACAGACGCGGACGATGATGTGAACACCT
ACAATGCCGCCATCGCTTACACCATCCTCAGCCAAGATCCTGAGCTCCCTGACAAAAATATGTTACC
ATTAACAGGAACACAGGAGTCATCAGTGTGGTCAACCTGGGCTGGACCGAGAGAGTTTCCCTACGT
ATACCCTGGTGGTTCAAGCTGCTGACCTTCAAGGTGAGGGGTTAAGCACACAGCAACAGCTGTGAT
CACAGTCACTGACACCAACGATAATCCTCCGATCTTCAATCCCACCACGTACAAGGGTCAGGTGCC
GAGAACGAGGCTAACGTGTAATCACCACTGAAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGT
CGTGGGAGGCTGTATACACCATATTGAATGATGATGGTGGACAATTTGTCGTCACCACAAATCCAGT
GAACAACGATGGCATTTTGAAAACAGCAAAGGGCTTGATTTTGAGGCCAAGCAGCAGTACATTCTA
CACGTAGCAGTGACGAATGTGGTACCTTTTGGAGGTCTCTCTCACCACCTCCACAGCCACCGTCACCG
TGGATGTGCTGGATGTGAATGAAGCCCCATCTTTGTGCCTCCTGAAAAGAGAGTGAAGTGTCCGA
GGACTTTGGCGTGGGCCAGGAAATCACATCCTACACTGCCCAGGAGCCAGACACATTTATGGAACAG
AAAATAACATATCGGATTTGGAGAGACACTGCCAACTGGCTGGAGATTAATCCGGACACTGGTGCCA
TTTCCACTCGGGCTGAGCTGGACAGGGAGGATTTTGGACAGTGAAGAACAGCAGTACACAGCCCT
AATCATAGCTACAGACAATGGTTCTCCAGTTGCTACTGGAACAGGGACACTTCTGCTGATCCTGTCTG
ATGTGAATGACAACGCCCCATAACCAGAACCTCGAACTATATTCTTCTGTGAGAGGAATCCAAAGCCT
CAGGTCATAAACATCATTGATGCAGACCTTCCCTCCAATACATCTCCCTTCACAGCAGAACTAACACA
CGGGGCGAGTGCCAACTGGACCATTAGTACAACGACCCAACCAAGAATCTATCATTTTGAAGCCA
AAGATGGCCTTAGAGGTGGGTGACTACAAAATCAATCTCAAGCTCATGGATAACCAGAATAAAGACC
AAGTGACCACCTTAGAGGTGAGCGTGTGTGACTGTGAAGGGGCCGCTGGCGTCTGTAGGAAGGCAC
AGCCTGTGGAAGCAGGATTGCAAATTCCTGCCATTCTGGGGATTCTTGGAGGAATTCCTGCTTTGCTA
ATTCTGATTCTGCTGCTCTTGCTGTTTCTTCGGAGGAGAGCGGTGGTCAAAGAGCCCTTACTGCCCC
AGAGGATGACACCCGGGACAACGTTTATTACTATGATGAAGAAGGAGGCGGAGAAGAGGACCAGGA
CTTTGACTTGAGCCAGCTGCACAGGGGCCTGGACGCTCGGCCTGAAGTGAAGTGAAGTGAAGTGAAG
CCAACCCTCATGAGTGTCCCCCGTATCTTCCCCGCCCTGCCAATCCCAGTGAATTTGAAATTTTAT
TGATGAAAATCTGAAAGCGGCTGATACTGACCCACAGCCCCGCCTTATGATTCTCTGCTCGTGTTG
ACTATGAAGGAAGCGGTTCCGAAGCTGCTAGTCTGAGCTCCCTGAACTCCTCAGAGTCAGACAAAGA
CCAGGACTATGACTACTTGAACGAATGGGGCAATCGCTTCAAGAAGCTGGCTGACATGTACGGAGGC
GGCGAGGACGACTAGCTCGAGTTTAAAGCTTGGGGGAGGCTAACTGAAACACGGAAGGAGACAATAC

CGGAAGGAACCCGCGCTATGACGGCAATAAAAAGACAGAATAAAACGCACGGTGTGGGTGTTTTGT
TCATAAACGCGGGGTTTCGGTCCAGGGCTGGCACTCTGTGATACCCACCGAGACCCATTGGGGA
GCTTGATATCGATAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTT
ACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCGCA
CCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTGATGCGGTATTTTCTCCT
TACGCATCTGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCAT
AGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACCCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGC
ATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTCTCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCCGTCATCA
CCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAA
TGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTTC
TAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAA
AAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTGCCCTTATTCCCTTTTTTTCGGCATTTTGCCTTC
CTGTTTTTGTCCACCAGAAACGCTGGTAAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGT
GGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAAGTTTT
CCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG
AGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAA
GCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACT
GCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCCTTTTTTGCACAACATGG
GGGATCATGTAACCTCGCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATAACCAACGACGAGCG
TGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATTAACCTGGCGAACTACTTACT
CTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCT
CGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTAT
CATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG
GCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAC
TGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCT
AGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCG
TCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTT
GCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC
CGAAGGTAACCTGGCTTACGACAGAGCGCAGATAACCAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGG
CCACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTG
CTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGATAAGGCGCA
GCGGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT
GAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTA
TCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTA
TCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGG
GGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGTGCTGGCCTTT
TGCTCACATGCATGTCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGAAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAG
GCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAAGTCCCAGGCTCCCC
AGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCG

CCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCCGCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTAT
 TTATGCAGAGGCCGAGGCCGCTCGGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGGA
 GGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTCCTCGATCGAGGAACTGAAAAACCAGAAAAGTTAACTGGTAAGTT
 TAGTCTTTTTGTCTTTTATTTTCAAGTCCCGGATCTACCATGACCGAGTACAAGCCCACGGTGCGCCTC
 GCCACCCGCGACGACGTCCCCCGGGCCGTACGCACCCTCGCCGCGCGTTTCGCCGACTACCCCGCCA
 CGCGCCACACCGTCGACCCGGACCGCCACATCGAGCGGGTCACCGAGCTGCAAGAACTCTTCCTCAC
 GCGCGTCGGGCTCGACATCGGCAAGGTGTGGGTCGCGGACGACGGCGCCGCGGTGGCGGTCTGGAC
 CACGCCGGAGAGCGTCGAAGCGGGGGCGGTGTTCCGCCGAGATCGGCCCGCGCATGGCCGAGTTGAG
 CGGTTCCCGGCTGGCCGCGCAGCAACAGATGGAAGGCCTCCTGGCGCCGCACCGGCCCAAGGAGCC
 CGCGTGGTTCCTGGCCACCGTCGGCGTCTCGCCCAGCCAGGGCAAGGGTCTGGGCAGCGCCGT
 CGTGCTCCCCGGAGTGGAGGCGGCCGAGCGCGCCGGGGTGCCCGCCTTCTGGAGACCTCCGCGCC
 CCGCAACCTCCCCTTCTACGAGCGGCTCGGCTTACCCTCACCGCCGACGTCGAGGTGCCGAAGGA
 CCGCGCACCTGGTGCATGACCCGCAAGCCCGGTGCCTGAAGATCCAGACATGATAAGATACATTGAT
 GAGTTTGGACAAACCACAACACTAGAATGCAGTGAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTAT
 TGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTT
 TCAGGTTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATGGCT
 GATTATGATCGAATCGATATC

C: pBApoK2-hCDH1の制限酵素地図



図C. pBApoK2-hCDH1の制限酵素地図

(5) SAWバイオナノ協調体用微小流体システムの設計製作に関する研究

東京電機大学

総合研究所

理工学部 生命理工学系

二井 信行・高野 温

田中 真人

平成21～24年度累計予算額：23,676千円（うち、平成24年度予算額：4,071千円）

予算額は、東京電機大学（(4)、(5)章）としての予算額であり、間接経費を含む。

平成20年度はナノテクノロジーを活用した環境技術開発推進事業予算にて実施。

[要旨]

微小流体システムにおいて、ガス透過性隔壁を介して隣接するジャケットリザーバによるCO₂ガス緩衝作用の下で、細胞培養を可能とするシステム（オンチップ・インキュベーション・システム）を開発した。更に、SH-SAWデバイスによる生体影響評価システム（SH-SAWバイオナノ協調体）とオンチップ・インキュベーション・システムを統合し、その性能評価を行った。その結果、CO₂インキュベータ内での細胞培養を必要とせず、パネルヒータ上での加温のみにて細胞培養を可能にした。この間、外界と隔離され物質移動は無く、滅菌状態は維持された。

この統合されたSH-SAWバイオナノ協調体オンチップ・インキュベーション・システム（SH-SAWバイオナノ協調体OCIS）で、(2)及び(3)章と同様に過酸化水素による細胞傷害モデル実験を実施し、細胞・細胞間結合の崩壊に起因するSH-SAWの変調信号を検出した。また、SH-SAW協調体OCIS内に作成した肺胞上皮組織に対して、低温耐性を試験した。パネルヒータによる加温を停止し、15℃に48時間曝した後、培地交換をせずに37℃に戻した。しかし、細胞は全く正常に接着しており、SH-SAW信号も低温処理以前の状態に速やかに回帰した。SH-SAW協調体OCIS内の肺胞上皮組織は、このような低温に対しても十分に耐性を持っており、その後のSH-SAW信号計測に支障は生じないことが示唆された。

[キーワード]

微小流体、表面弾性波、細胞培養、低温耐性

1. はじめに

従来の抗体や酵素を用いた抗体型や酵素型バイオセンサの様に、単に特定物質の計測を行うのではなく、環境汚染物質や環境化学物質が生体に与える影響を「細胞や組織に対する機能的・構造的変化」として計測し、生体影響評価に資する新規バイオセンサとして、「バイオナノ協調体」が本研究の(2)及び(3)章で提唱・検討された。その結果、表面弾性波（SH-SAW）デバイス上に形成した肺胞上皮組織（SH-SAW肺胞上皮協調体）における細胞・細胞間結合や細胞内部構造に起因して、SH-SAW伝搬波の挿入損出は増大し、伝搬時間（位相差／伝搬速度）は短縮（増大）することが判明した。

本サブテーマにおいて開発されるべき微小流体システムとしては、

①SH-SAW肺胞上皮協調体を収納するオンチップ・インキュベーション・システム（OCIS）におい

て、播種した肺胞上皮細胞を長期培養し、生体影響評価が可能である。

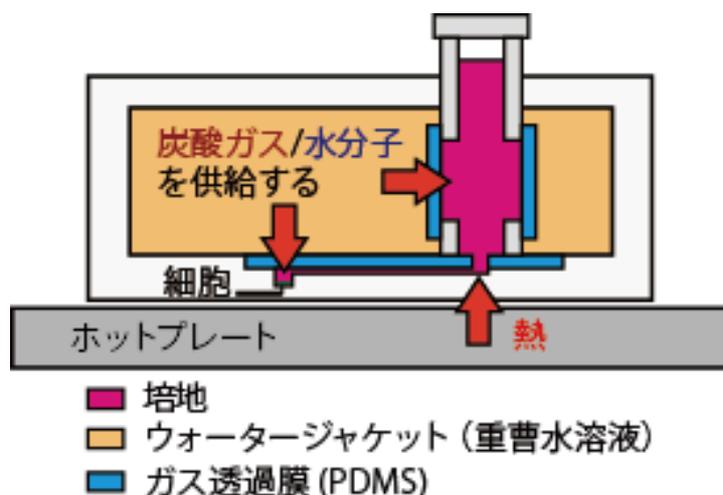
②オンチップ・インキュベーション・システムがコンパクトかつポータブル化され、外部との電氣的接続も簡素化されている。

これらの要件を満たす技術的検討を行うこととした。



図(5)-1. 微小（マイクロ）流体チップを用いて細胞培養することと細胞培養系自体をポータブル化することとの相違

微小流体チップを用いることにより、細胞数（播種面積）と培地体積を減少させることは可能である。しかし、培地の物理化学的条件を一定にするための雰囲気制御用の機器、具体的には、CO₂インキュベータならびにガスタンクの必要性は変わらない。むしろ、微小流体チップを使ったシステムのほうが、厳密な雰囲気制御を必要とする。これは、主に、培地の表面/体積比の増加と、透明さと低毒性により細胞培養用チップに用いられるポリジメチルシロキサン(PDMS)の高いガス透過性によるものである。



図(5)-2. PDMS隔膜と重曹水溶液を用いたオンチップ・インキュベーションの原理

重曹水溶液を加熱すると、重炭酸イオンと炭酸の間の平衡移動によりCO₂ガスを発生し、さらに水分の蒸発も促進される。そのため、CO₂ガスと水を透過するPDMSを介して重曹水溶液と培地を接触させると、CO₂と水が緩衝作用を受ける。

まず、SH-SAWバイオナノ協調体をCO₂ インキュベータ内で培養する限り、周辺装置のポータブル化は望めない(図(5)-1)。そこで、SH-SAW肺胞上皮協調体を収納する微小流路に隣接する形で、ジャケットリザーバを設置し、その内にCO₂ガス緩衝作用を持つ炭酸水素ナトリウム水溶液を入れ、ガス透過性隔壁を介して、培地中のpHが維持できる OCIS を開発した(図(5)-2)。

OCIS を用いてSH-SAW肺胞上皮協調体をポータブル化することには、以下の利点が考えられる。

- (a)SH-SAW肺胞上皮協調体を作製し、更にOCIS に組み込むプロセスを確立すれば、その役割を将来メーカーが担うことで、ユーザーに品質が保証されたSH-SAW肺胞上皮協調体等のOCISパッケージを、安定して提供することができる。
- (b)細胞をOCIS にパッケージ化することで、細胞を扱うための高度技能スタッフや専用設備を、各々の検査機関が必ずしも保持する必要がなくなる。即ち、バイオナノ協調体を用いた毒性スクリーニング等に対して、導入及びランニングコストの削減に貢献できる。
- (c)バイオナノ協調体OCISを用いて得た毒性評価結果は、各々の検査機関を亘って比較検討、データベース化できる。このことが、毒性評価分野に於けるコモディティ化を促進し、一層のコスト削減と環境モニタリング、或いは、膨大な数の環境化学物質の影響評価に貢献できる。

但し、メーカーが製造したSH-SAW肺胞上皮協調体OCIS が、ユーザーの元に配送される途中で、パッケージ内の肺胞上皮組織に不可逆的傷害は起きず、培養を再開した際には速やかにSH-SAW信号を回復するか、検討が必要である。

2. 研究開発目的

本研究の目的は、バイオナノ協調体を搭載することが可能で、外部のバルクな系統(配管・光学検出系・電子計測器など)と切り離しが可能な閉鎖系であること。輸送中も滅菌状態で培養細胞を維持でき、容易に検体の導入や評価を可能とする微小流体プラットフォームを開発することである。本研究では、2重リザーバの微小流体チップ単体のみを底部から保温するだけで、CO₂インキュベーションを可能とする OCIS (オンチップ・インキュベーション・システム)を開発し、当該システムを用いた長期細胞培養試験を行い、当該システム内の加湿とCO₂の供給が長期間にわたって正常に行われているかどうかを検証した。次に、SH-SAWデバイスによる生体影響評価システムと OCIS を統合し、その性能評価を行った。SH-SAW協調体OCIS パッケージをメーカーからエンドユーザーへ送付する際に、培養温度を37°Cに維持し続け、培地を循環させるための駆動系を作働し続けることは、装備の重量化煩雑化とコスト増大を招く。むしろ、常温かつ培地循環を行わない条件でOCISパッケージを輸送できることが望ましい。そこで、OCISパッケージを常温ないしは低温かつ培地を静置条件においた際、細胞が生存でき、37°Cに復帰後は発送前の状態に回復してSH-SAW計測が継続可能であるかどうかの検証も行った。

3. 研究開発方法

(1) 研究開発の方針

本研究開発の目的に照らし合わせて、以下のように設定した。

- a) 微小流体環境を滅菌・無毒化したうえで細胞を導入できる。
- b) 細胞周囲の物理化学的環境を長期間維持できる。
- c) 細胞の状態および挙動を、当該微小流体システムに組み込んだSAWなどの固体センサで検

出できる。

一般に、以上の要素を両立することを目指すとなると、一般的には、“Lab on a Chip”的指向の集積化的アプローチをとることが多い。しかし、バイオナノ協調体自体が開発途上であることを踏まえて開発のプロセスを迅速に行い、さらに、細胞の維持とセンサのパッケージングのそれぞれに最適かつ無理のない設計を採用するためには、それぞれの技術的要素を独立させて分離した状態で設計できることが望ましいと考えた。よって、本分担研究においては、非集積的アプローチをとった。具体的には、以下の要素からなる微小流体システムの実現を目指した。

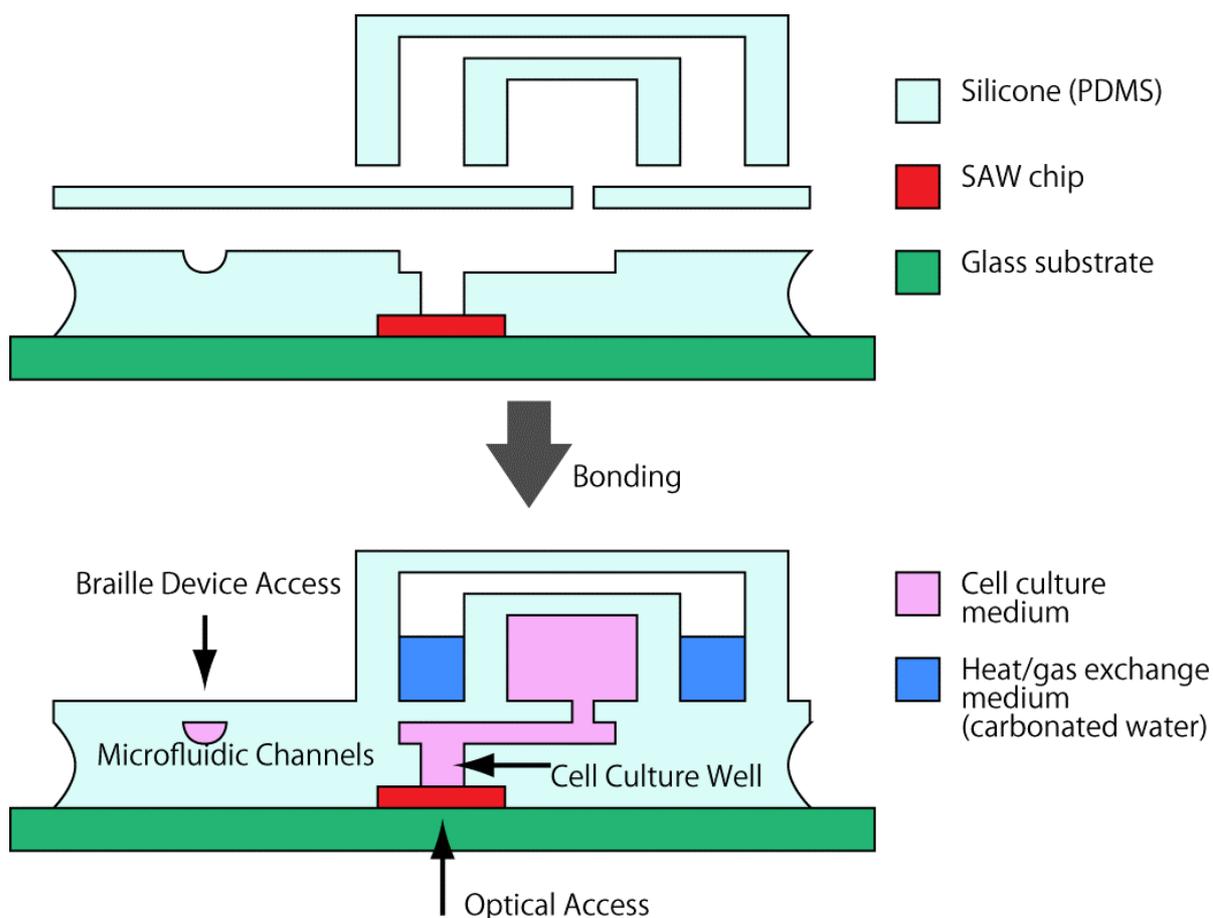
- a) 外部からの変形により、内部の流体を駆動できる微小流路を含むコンパクトな細胞培養系
- b) 大型機器の力を借りずに、内部の（細胞培養に適した）環境の維持を可能とする方法
- c) 研究段階の評価にも容易に用いられる単機能の SH-SAW 基板を、b)のチップ内に絶縁的に封止し、さらに当該 SH-SAW の伝搬する面のみを細胞培養表面としてチップ内に提供する手段

以上3点のうち、a)単体については、ポリジメチルシロキサンを主成分とするエラストマー（以下PDMS）のソフトリソグラフィを応用し、市販の点字ディスプレイ用の部品で外部から流体駆動が可能な細胞培養システムを開発し、良好な結果を得ている¹⁾。そこで、本分担研究においては、b)ならびにc)を、a)に統合できるかたちで新規に開発することとした。さらに、このような機能をもつ微小流体チップの設計時に考慮する点として、細胞や培地等の液体の導入や交換の容易さ、光学的アクセスの容易さ、そして製作の容易さも考慮する必要がある。

（2）微小流体チップの基本設計

1) マイクロチップ内における培地の物理化学的環境の維持（OCIS）

PDMS ベースの微小流路を適用すると、次に、流路内部の物理化学的環境を如何にして維持するか課題を解決する必要がある。PDMS 自体は、水分子と CO₂ ガスの透過性が極めて高く、PDMS 流路内に封入された細胞培養用培地は、時間経過と共にその浸透圧と pH が過剰に上昇する。この課題に対し、従来は、外部のシリンジポンプと直結して灌流培養とする、既成の CO₂ インキュベータに格納する、培地の組成を調節して緩衝能力を高めるなどの対策が採用されていた。しかし、このいずれも、バイオナノ協調体の搭載という目的には適合しない。そこで、**図(5)-2**に示すように、培地は PDMS 流路内に密封された状態で、培地リザーバ及びその PDMS 微小流路を取り囲む形で、外側にもうひとつのリザーバを作り、二重リザーバ構造とする。外側のリザーバには、加温した炭酸水素ナトリウム水溶液（重曹水）を配置し、細胞培養に必要な温度の安定化と CO₂ ガスと浸透圧の緩衝化をコンパクトに行うこととした。**図(5)-2**に示したように、OCIS の外側リザーバに重曹水を導入することによって、熱、CO₂、水分子が PDMS を拡散して培地に供給される。その結果、培地の温度を恒温に保ち、pH と浸透圧の上昇を抑止することができる。



図(5)-3 本サブテーマで開発する細胞長期培養用の閉鎖系微小流体システムの模式図

SH-SAW素子は、その一部（センシング用領域：伝搬面）を細胞培養用表面として露出している。その培養用表面周囲の培地は、外部の点字デバイスで循環させることにより、OCISが完全閉鎖系でありながら、流路内部で培地の温度、pH、浸透圧を緩衝化できる。外側に、炭酸水素ナトリウム水溶液のリザーバ（青）を配置することで、CO₂インキュベータによる高湿度、5%CO₂ガスの雰囲気無くとも、培地のpHと浸透圧を正常に保つことができる。

2) 微小流体チップへのSH-SAW素子の組み込み

平成20年度は、理化学研究所にて行われた研究成果をもとに、GaN HEMT（窒化ガリウム高電子移動度トランジスタ）をバイオナノ協調体中の検出素子として使用することを想定し、GaN HEMT素子の試作ならびに同素子の搭載を想定した微小流体デバイスの設計を行った。平成21年度以降、当該用途の検出素子は、弘前大学により開発されたSH-SAW素子に一本化されたが、GaN HEMTの搭載を想定した微小流体デバイスは、そのままSH-SAW素子にも適用可能であると判断した。そのため、SH-SAW伝搬波の到達時間を測定するための計測系を導入した。基本的には、平成20年度に報告した微小流体システムの変更にせず、弘前大学が開発を進めていた細胞培養可能なSH-SAW素子を用いて、微小流体デバイスと統

合可能なパッケージを試作した。更に、作製した SH-SAW デバイスと OCIS との統合パッケージに、弘前大学と同様に不死化肺胞 2 型 (SV40-T2) 細胞を播種・培養し、SH-SAW の到達時間を測定した。図(5)-2 及び 図(5)-3 に、OCIS、微小流路からなる培地循環系、そして SH-SAW 素子の 3 者を統合したシステムの模式図を示す。まず、図(5)-3 に示したシステムは、当該システムの外部に設置した点字アクチュエータの各ピンの蠕動運動により、エラストマーからなる流路内の培地に脈流を発生させ、チップ内の培地を循環させられるようにした。同時に、弘前大学にて開発された SH-SAW 基板 (LiTaO₃ 単結晶) の伝搬面が、微小流路内の一部 (細胞培養領域) に露出して、細胞の播種・培養が可能な状態に配置されなくてはならない。また、播種した細胞が SH-SAW 基板に安定して接着しているか、SH-SAW 信号を計測している期間中も細胞の状態を観察できるように設計する必要がある。そこで、SH-SAW 素子をマウントし、かつ電気配線を担う基板を、透明・平坦で硬さのあるガラス基板をベースしたものにすることで、SH-SAW 素子の他、電気電子要素の実装を容易とした。さらに、その上部に、センサの表面と直結した微小流路の層、点字デバイスによって変形する膜層、細胞培養用培地や OCIS のためのリザーバの構造を、該当する PDMS やその他透明樹脂からなる構造を積層して形成した。

(3) 微小流体チップの実装

1) 細胞の長期培養と微小流体細胞培養に対応したチップ

a) チップの外観と構造

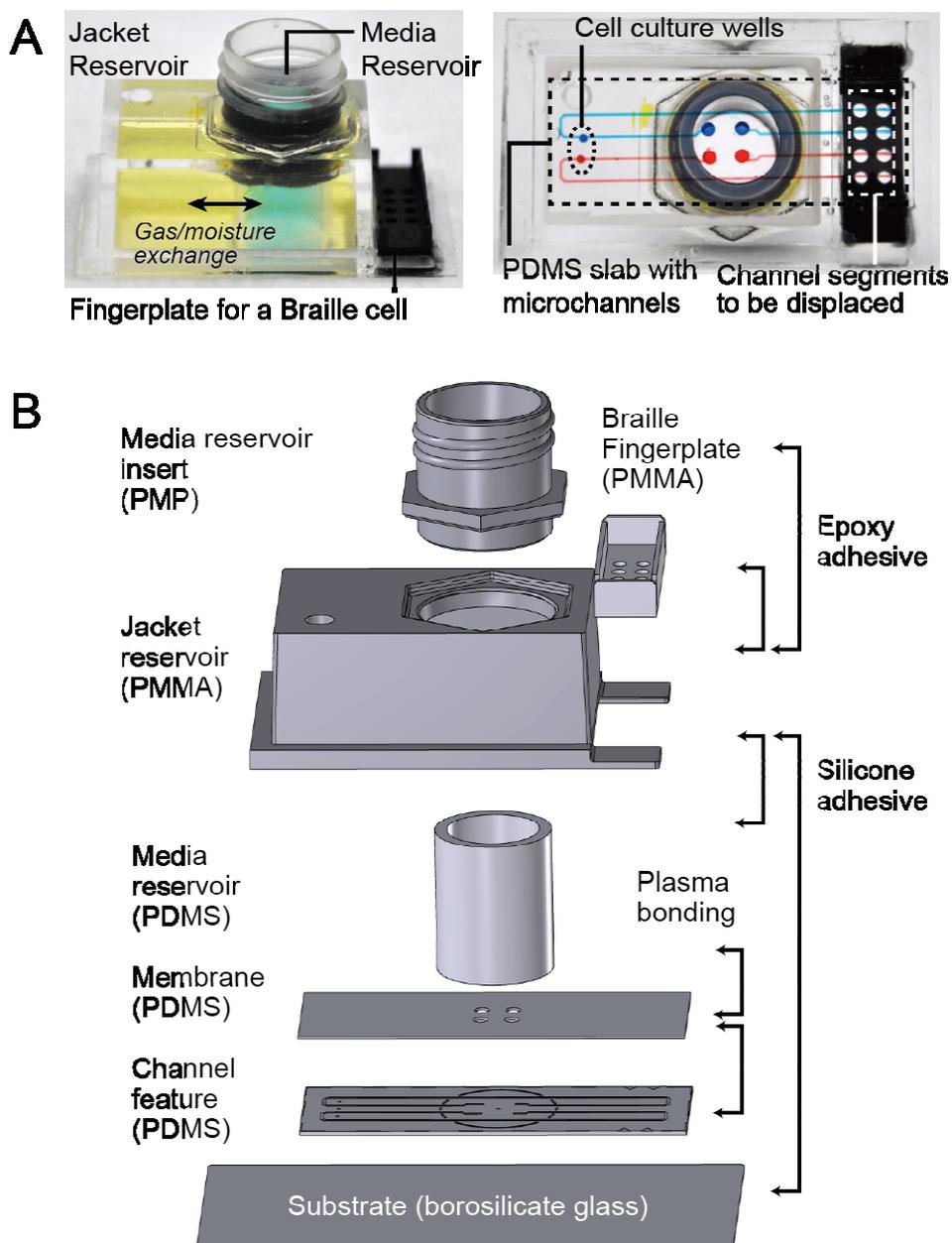
図(5)-2 並びに 図(5)-3 に示した構想に従って、長期細胞培養用微小流体チップを実施期間中に数タイプ試作したが、このうち、最終バージョン(2012年)のチップの外観と構造 (組立図) を 図(5)-4 に示す。図(5)-4A に示すように、本チップは、ねじ口をもつ円筒状の領域に培地を、その外側のジャケットに重曹水溶液を導入できるようになっている (以降、それぞれ培地リザーバ、ジャケットリザーバと呼ぶ)。円筒部分はポリジメチルシロキサン(PDMS)からなり、培地リザーバとジャケットリザーバとの間で水分・ガスが透過するようになっている。底部は0.45mm厚のカバーガラスであり、倒立顕微鏡による内部 (底部) の観察が可能となっている。また、底面をホットプレート等の上に静置して加温するだけで細胞培養に必要な条件を整えることができ、保温時と観察時の取り回しの容易さに貢献している。

b) 微小流路

図(5)-4 に示すチップの底部にあるガラス基板の上には、PDMS製の流路形状の層 (微細加工した凸型より型取りにより転写した凹溝形状。以下、流路層)、そのさらに上に同じく PDMS製の膜(0.15mm厚: 以下、膜層)を接合し、流路を形成する。流路は培地循環用につき、培地リザーバに入口と出口をもつ単純なループである。1チップあたり同一仕様のループが2系統搭載されている。各ループの中間部に、細胞培養用ウェル (落とし穴) を形成した。これは、流路層に直径1mmの穴を穿孔したものであり、その底部はガラス基板の表面となる。このため、ガラス基板上で細胞を培養することとなる。これは、特に共焦点顕微鏡で細胞を観察するときに有利である。

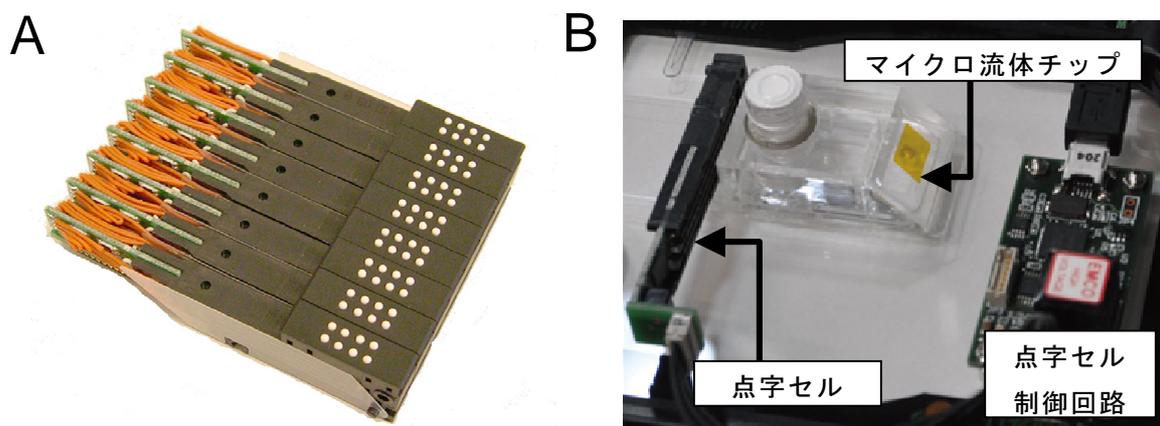
c) 点字セルによる培地循環

膜層はそれぞれPDMS製であるため、流路内の水分とガスがPDMS内を拡散することで失われるのを防ぐため、培地の大部分を収める培地リザーバはジャケットリザーバ内に格納してある。しかし、流路層と膜層のすべてをジャケットリザーバ内に囲うと、流路内の培地をポンプする手段がなくなる。そこで、流路層と膜層の一部（写真では右側）をジャケットリザーバ外に露出させ、その個所には **図(5)-5A** に示す点字セル（点字ディスプレイの1文字分をなすアクチュエータアレイ）に取り付けられる指板を接着し、流路層のカバーとしてある。培地循環が必要な際には、この指板部分に点字セルを装着することで、大がかりな送液装置を必要とせず、コンパクトに実施できる（**図(5)-5B**）。



図(5)-4. 細胞長期培養のためのオンチップ・インキュベーション・チップ

A) チップ外観図。培地用リザーバが内側に、ジャケット溶液用リザーバが外側に配置されている。それぞれのリザーバは、ポリジメチルシロキサン(PDMS)製の筒型の壁面で仕切られ、両リザーバ間のガス・水分子の交換を容易としている。リザーバの下面には、2組のマイクロ流路のループを含むPDMS層が配置されている。各流路は入口・出口を有し、それぞれ培地リザーバに連通している。PDMS層の一部はジャケット溶液用リザーバの外側に露出し、点字アクチュエータによるポンプを可能としている。B) 同チップの分解図。このうち、PMPとPMMAの部品、ならびにPDMS筒は射出成形による成形品であり、チップ1個あたりのコストの低下に寄与している。



図(5)-5. 点字ディスプレイ用アクチュエータによるマイクロ流体チップの駆動

A) 点字セル 8 個の直列接続アレイ。各ピン（写真中の白点）が外部からの電気信号により指板面に垂直な方向に上下する。点字 1 文字(2×4 ピン) 8 個からなる部分が 1 個の点字セルであり、それぞれ独立しているため、点字セル単位で切り離して使用することができる。B) 点字セルを装着した長期培養用微小流体チップ。微小流体チップの指板を接着した部分（図(5)-3A を参照）に点字セル 1 個を装着する。点字セルを専用の制御回路に接続すると、USB ポートを介してパソコンから電源供給と点字ピンの制御が行える。なお、制御回路はマイクロプロセッサを搭載しているため、電源を供給することで、パソコン無しで点字ピンを制御することも可能である。

(4) 微小流体チップの評価

1) オンチップ・インキュベーションの評価

培地リザーバには、浸透圧測定用に 290 mmol/kg 標準液、 $p\text{CO}_2$ (二酸化炭素分圧) 測定に 10 mM 炭酸水素ナトリウム溶液 (pH8.5)、細胞培養用には培地(DMEM+5%FBS)を導入し、ねじロキャップで封止した。ジャケットリザーバには、 NaHCO_3 と Na_2CO_3 の水溶液を導入した。 NaHCO_3 の濃度は0.8Mに固定し、 Na_2CO_3 の濃度は20、50、65、75、100mMとした。その後、培地リザーバ内の液体を点字セル(KGS株式会社 SC11)の蠕動パターン(1ステップ/秒)で循環させつつ、チップ底部をホットプレートで37°Cに加熱した。培地リザーバ内部の液体の浸透圧とpHの測定は、それぞれ浸透圧計(Wescor 5100C)、pHメータ(堀場製作所F-51)で行った。pHと各種定数(ヘンリー定数 K_H 、炭酸の第1、2解離定数 K_1 、 K_2)より、 $p\text{CO}_2$ 値を以下の式で算出した。

$$p\text{CO}_2 = \frac{c_0}{K_H}$$

$$c_0 = \frac{C_T}{1 + \frac{K_1}{10^{-\text{pH}}} + \frac{K_1 K_2}{10^{-2\text{pH}}}} @ \frac{A_{\text{Na}}}{\frac{K_1}{10^{-\text{pH}}} + \frac{K_1 K_2}{10^{-2\text{pH}}}}$$

ただし、 c_0 は炭酸の濃度 ($[H_2CO_3]$)、 C_T は溶存総炭酸類濃度 ($[H_2CO_3]+[HCO_3^-]+[CO_3^{2-}]$)、 A_{Na} はナトリウム濃度 (この場合、 $A_{Na} = 10 \text{ mM}$ となる)、 K_H は気相 CO_2 のHenry定数、そして K_1 と K_2 は炭酸の第1、第2解離定数である。

K_H 、 K_1 と K_2 の値は、温度 T の関数として、以下の式より算出した

$$-\log K_1 @ -356.3094 - 0.06091964T + \frac{21834.37}{T} + 126.8339 \log T - \frac{1684915}{T^2},$$

$$-\log K_2 @ -108.3865 - 0.03252849T + \frac{5151.79}{T} + 38.92561 \log T - \frac{563713.9}{T^2},$$

$$\log K_H @ 108.3865 + 0.01985076T - \frac{6919.53}{T} - 40.4515 \log T + \frac{669365}{T^2}.$$

細胞培養については、流路をフィブロネクチンでコート後、サル腎臓由来細胞株COS-7の懸濁液をチップ内のウェルに導入し、培地リザーバ内の培地を点字デバイスで循環させつつ、定期的に倒立位相差顕微鏡(ライカ DMIL LED)で観察した。

2) SH-SAWによる細胞間結合の評価

次に、SH-SAW チップを用いて、細胞単層の細胞間結合の崩壊に伴うSH-SAWの遅延の変化を評価した。評価のためのセットアップを図(5)-6 に示す。

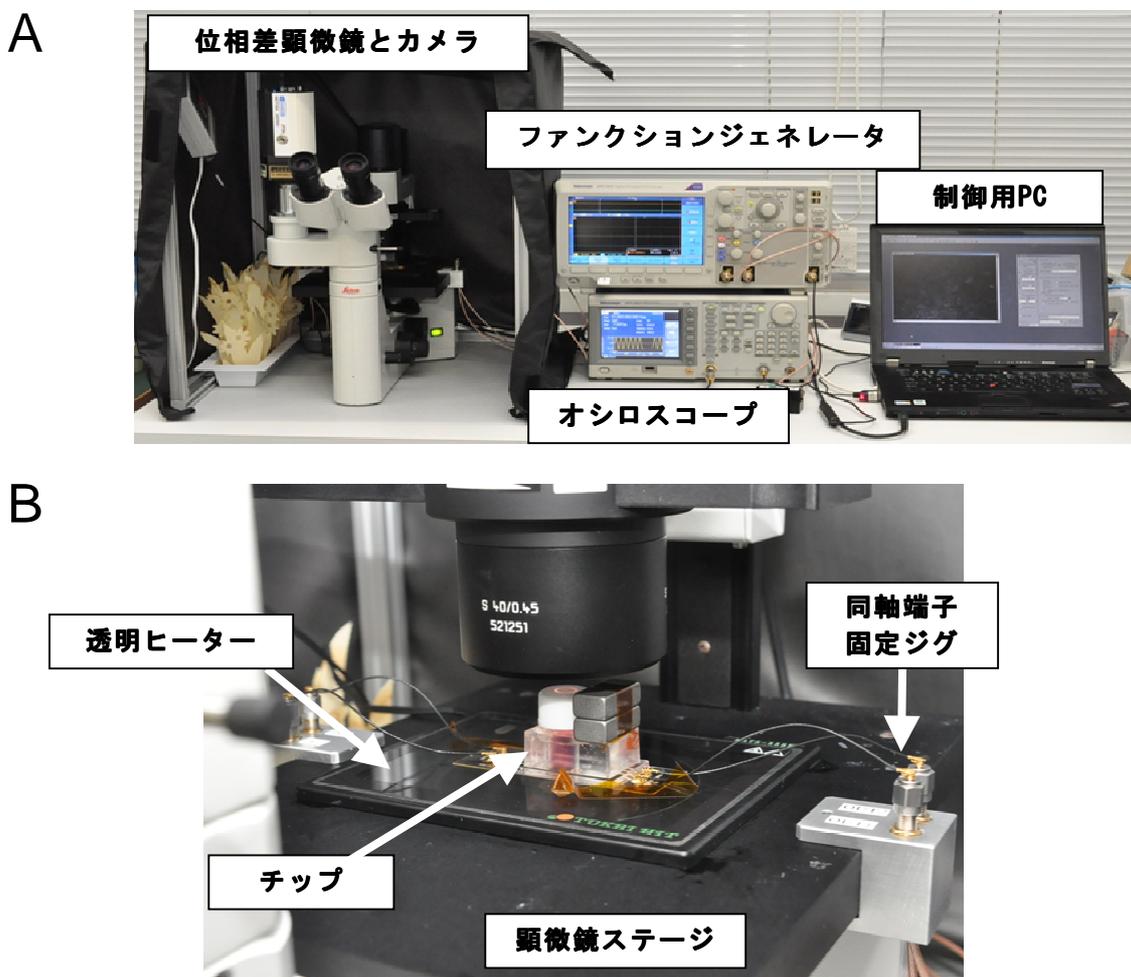
まず、ラット由来肺胞2型上皮細胞SV40-T2をチップの培養ウェルに播種した。細胞播種後、透明ホットプレート(37°C)を配置した顕微鏡ステージ上で、コンフルエント状態(およそ48h)まで培養した。その後、過酸化水素(H_2O_2)を培養ウェルに最終濃度1mMで添加した。この間、位相差顕微鏡に取り付けたCCDカメラにて10min間隔でタイムラプス撮影を行った。同時に、バースト正弦波(51.0MHz、-10dBm @50Ω、50cycles)を楕型電極間に印加し、対向する楕型電極間電圧の波形をオシロスコープで30min毎に集録した。なお、以上の入力印可と出力波形の集録は、USBと自作の制御用ソフトウェアを介してすべて自動で定時間隔にて行った。

得られた出力波形から、その到達時刻を、出力波形のうち振幅最大のものに注目することで決定した。そして、各時点での出力波の到達時刻と、計測開始時における同・到達時刻との差を遅延時間とした。以上の解析は、グラフ作成ソフトウェアIgor Proの自動化機能にて実装したため、ほぼ自動に近い形で行った。

3) 低温輸送耐性の評価

さらに、チップに細胞を播種後、製造所からエンドユーザに通常の物流経路を介して送付することを想定した、培地循環も、加温もない状態での輸送を模した低温耐性実験を行った。

まず、図(5)-5 に示すチップに細胞を播種し、細胞の接着と単層形成のため、サーモプレートを用いて24時間 チップ底面を37°Cに加温した。その後、48時間 同サーモプレートにてチップ底面を15°Cに低温保持し、その後、チップ底面を37°Cに再び加温した。細胞播種直後よりSAW波形取得を開始し、SH-SAW計測開始直前とSH-SAW計測開始96時間後(4日後)に位相差顕微鏡にて細胞を撮影した。



図(5)-6. タイムラプス撮影及びSH-SAW計測のセットアップ

A) 全体図。CCDカメラ(QImaging Retiga200R)を搭載した倒立顕微鏡(Leica DMIL LED)にチップを静置し、培養ならびに観察を行う。チップ上のSH-SAW素子は、同軸ケーブルを介してファンクションジェネレータ(Tektronix AFG3521)とオシロスコープ(同DPO3032)に接続する。CCDカメラ、ファンクションジェネレータ、オシロスコープの制御と画像・信号集録は、1台のノートPCにて行う。B) 倒立顕微鏡のステージ部。ステージ上に透明ヒーター(東海ヒット サーモプレート)を搭載し、その上にチップを静置した。これにより、チップ底面を37℃にしつつ底面の細胞を観察できる。チップとファンクションジェネレータならびにオシロスコープ間の接続は、固定ジグでステージ上に固定した端子を介して行う。

4. 結果及び考察

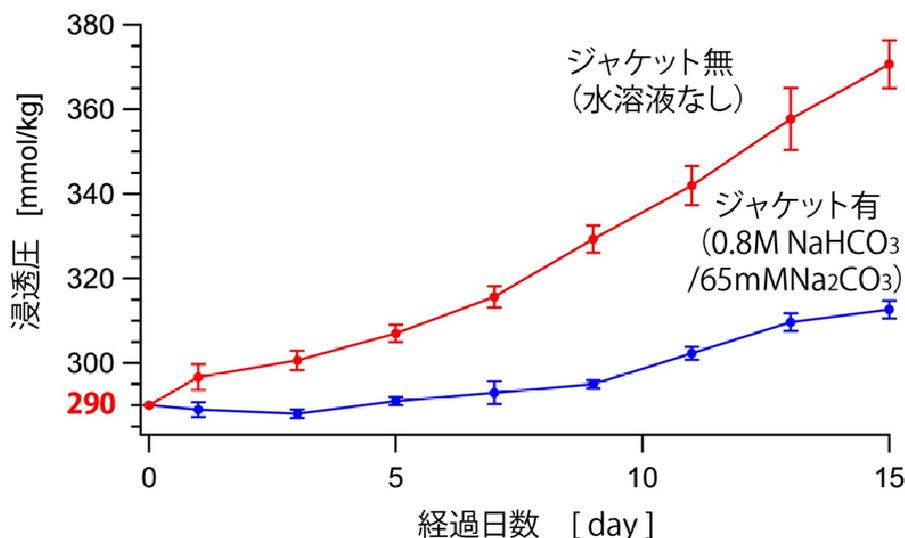
(1) 微小流体チップのインキュベーション能力の評価

1) 浸透圧

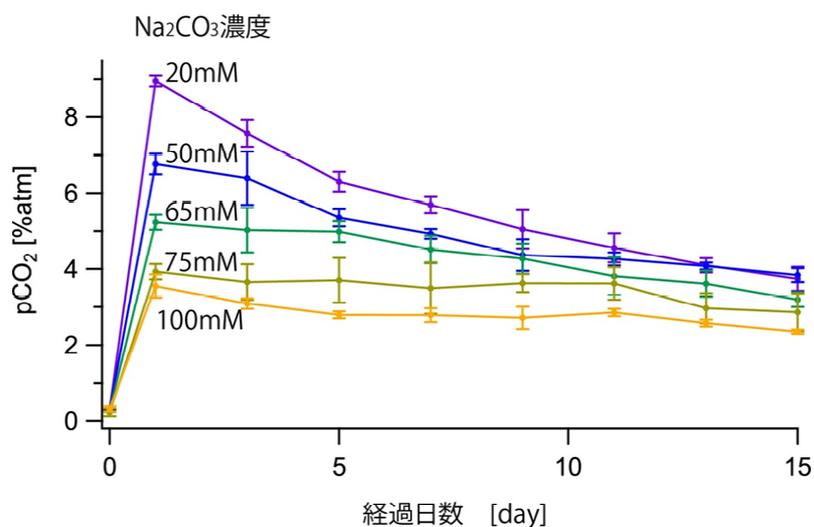
長期細胞培養用微小流体チップを用いて、浸透圧標準液を15日間のインキュベーションしたときの浸透圧変化を図(5)-7に示す。ジャケットリザーバ内に重炭酸塩/炭酸塩水溶液(0.8M NaHCO₃/65mM Na₂CO₃)を封入してインキュベーションを行った場合(ジャケット有)と、ジャケットリザーバに液体を封入しなかった場合(ジャケット無)で、培地リザーバ内の浸透圧標準液の浸透圧を比較した。ジャケット有は、一般的な細胞培養における浸透圧変化の許容範囲とされる±10mmol/kgにほぼ収まることがわかった。対して、ジャケット無では、浸透圧が約6mmol/kg/dayで上昇した。この結果より、ジャケットリザーバに封入した液体から生じる水分子が、培地リザーバのPDMS筒を透過することで、浸透圧標準液の蒸発を防いだことがわかる。また、ジャケット無しの浸透圧では、10日目以降で浸透圧に誤差が生じやすい傾向が確認された。これは、PDMS筒に含まれた水分の影響と考えられる。浸透圧測定実験は、チップを使い回しまわして行ったため、ジャケット有りの条件で測定に用いた後、洗浄してジャケット無の測定に使用したケースもあった。そのため、PDMS筒が水分を含んだ状態になっていたことが考えられる。すなわち、PDMS筒に含まれた水分が浸透圧の変動に抑制をかけた状態になり、10日目前後で筒に含まれた水分がなくなり、浸透圧が上昇した。

2) pCO₂ (二酸化炭素分圧)

続いて、ジャケット液の組成と、培地リザーバ内のpCO₂の関係性を評価した。ジャケット液は、0.8M NaHCO₃の濃度は固定し、Na₂CO₃は、濃度を20、50、65、75、100mMの5種類とし、チップ上のpCO₂を15日間にわたり測定し、濃度ごとのpCO₂の移り変わりを調べた。その結果を図(5)-8に示す。この結果から、0.8M NaHCO₃と20-100mM Na₂CO₃の組み合わせにより、15日間のインキュベーション期間中に、培地リザーバ内のpCO₂を3-8%間でコントロールできることがわかった。これは、Na₂CO₃がNaHCO₃を緩衝したためであり、加えたNa₂CO₃の濃度が大きくなるほど、緩衝能が高くなりCO₂ガス発生の反応が穏和になり、チップ上のpCO₂が低くなることがわかった。20mM、50mM Na₂CO₃の場合、pCO₂の値は、インキュベーション開始後に急激に上昇し、その後、急落する現象(オーバーシュート)が確認できた。対して、75mM、100mM Na₂CO₃では、オーバーシュートがなく15日間にわたり比較的安定したpCO₂が得られた。CO₂ガスの発生が穏和になったためであり、Na₂CO₃濃度は、単にpCO₂の値を決めるだけでなく、長期間にわたり安定したpCO₂を得るためにも重要な要素であるといえる。



図(5)-7. オンチップCO₂インキュベーションに対応した微小流体チップの底部を15日間37°Cに加温した際の、培地リザーバ内290mmol/kg浸透標準液の浸透圧の変化
ジャケット無しでは、約6mmol/kg/dayの割合で浸透圧が上昇していくのに対して、ジャケット有りでは、特に9日目までは、ほぼ浸透圧の変化が見られなかった。



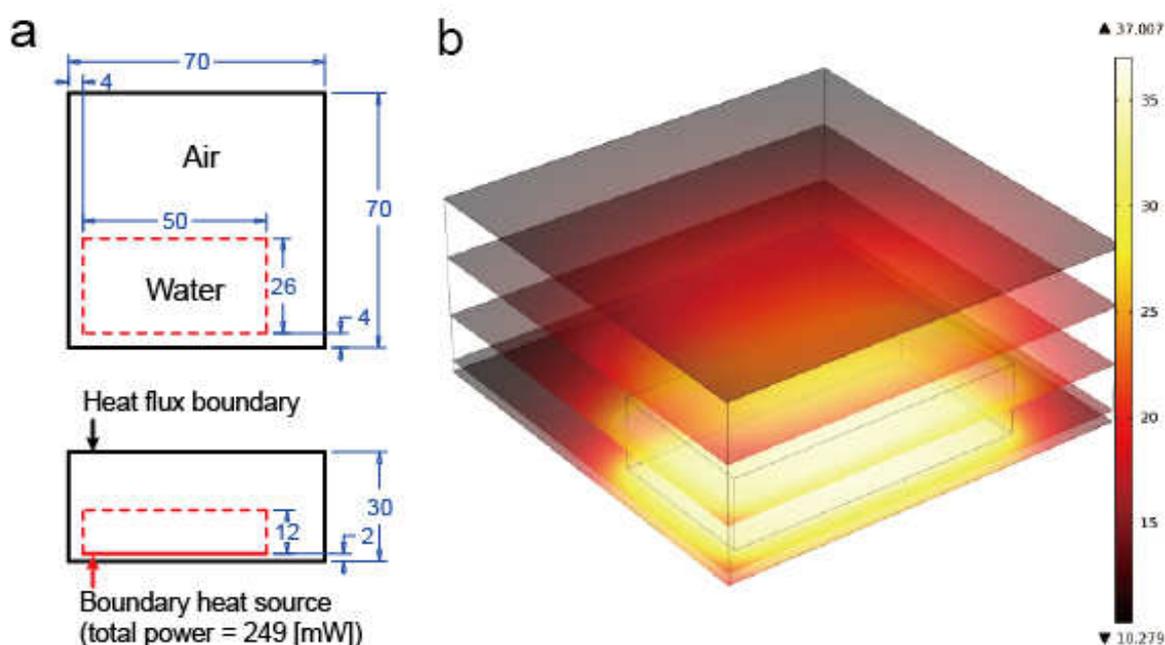
図(5)-8. オンチップCO₂インキュベーションに対応した微小流体チップの底部を15日間37°Cに加温した際の培地リザーバ内のpCO₂の変化、ならびにジャケット液に添加したNa₂CO₃の濃度との関係

0.8M NaHCO₃水溶液に加えるNa₂CO₃水溶液の濃度を変えることで、培地リザーバ内のpCO₂を3-8%程度までコントロールできる。加えたNa₂CO₃の濃度が濃いほど、NaHCO₃を緩衝するため、オーバーシュートの少ないpCO₂が安定的に得られる。

3) 保温時の消費エネルギー

本微小流体チップを外気温 10°C 、内容積 $70\text{ mm} \times 70\text{ mm} \times 30\text{ mm}$ の 2 mm 厚の発泡スチロールに梱包し、底面を 37°C に加熱したときの所要仕事率を、有限要素シミュレーションソフトウェア(COMSOL Multiphysics V4.0)を用いて数値的に求めた。モデルの概要とシミュレーション結果(温度プロファイル)を図(5)-9に示す。

具体的には、 10°C の静止空気に静置した 2 cm 厚の発泡スチロール(熱伝導率 $0.04\text{ W}/(\text{m}\cdot\text{K})$)箱内のチップの底面のみをヒーターで 37°C に加熱した際にヒーターから発せられる仕事率として求めた。シミュレーションの結果、ヒーター温度が 37°C のときの仕事率は 249 mW であった。点字セルの駆動回路の電源電流は実測で $50\text{ mA} @ 5\text{ V}$ であったため、上記仕様で梱包時に細胞培養を維持するために必要な電力は 500 mW と見積もられた。これは、市販のUSB充電バッテリーでも数日以上維持できるレベルの供給電力である。



図(5)-9 発泡スチロール箱、細胞培養チップ、ヒーターからなる系の熱解析

a) モデルの寸法(正面図と上面図)。チップは、PMMAと水の熱伝導率が近い値であることより、チップの寸法($50\text{ mm} \times 26\text{ mm} \times 12\text{ mm}$)の水の塊であるとした。水塊の下面を一定仕事率の面熱源とした。厚さ 0.02 m (2 cm)の発泡スチロール(熱伝導率 $0.04\text{ [W}/(\text{m}\cdot\text{K})]$)は、面積 $70\text{ mm} \times 70\text{ mm} \times 30\text{ mm}$ で、外面の温度を 10°C とした定熱流束境界条件($0.04 / 0.02 = 2.0\text{ [W}/(\text{m}^2\cdot\text{K})]$)とした。

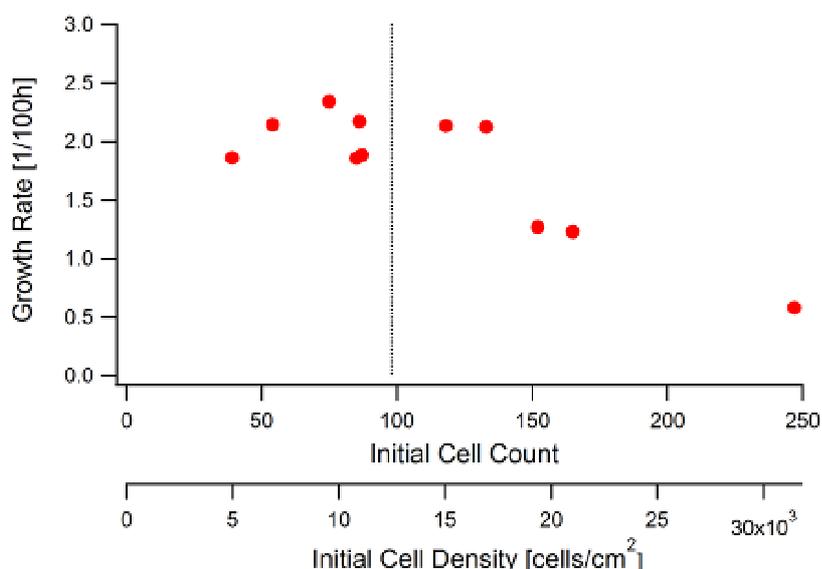
b) 底面からそれぞれ 2 mm , 1 cm , 2 cm , 3 mm 上部における表面温度のプロファイルを示すシミュレーション結果。最高温度 37.007°C が、ヒーターの仕事率を 249 mW に設定したときに得られた。

4) 細胞の長期培養

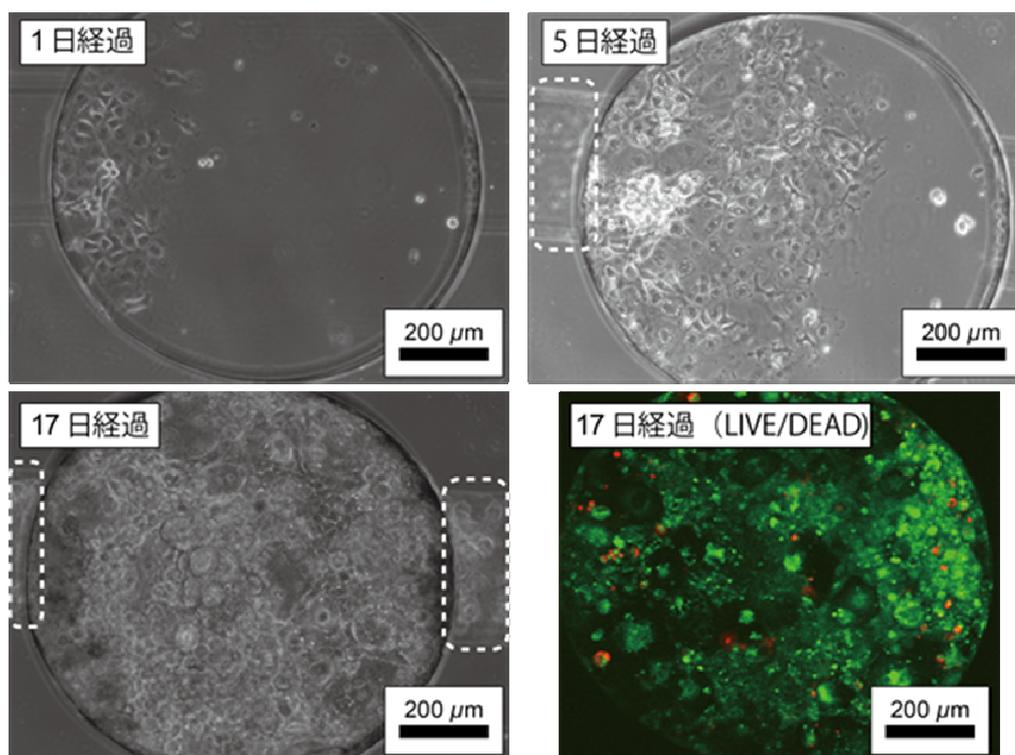
図(5)-10は、OCISのウェル(直径 1 mm)に導入したCOS-7細胞の初期細胞数(播種密度)と増殖率との関係を示す。COS-7細胞の標準的な播種密度($12.5 \times 10^3\text{ cells}/\text{cm}^2$)を含む、 $5.0 \sim 17.0$

$\times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ の範囲内において、 $0.02/\text{h}$ (倍加時間 35 h)程度の増殖率であり、通常のディッシュ等による培養と同様の増殖特性を示すことがわかった。

開発したマイクロ流体チップによる17日間オンチップ CO_2 インキュベーションでの細胞培養の結果を図(5)-11に示す。細胞の導入後まもなく接着し、1日経過後には細胞の増殖も見られた。細胞は、移動と増殖を繰り返し、5日後には細胞培養ウェルからマイクロ流路に移動する細胞群を観察した(図(5)-11 白破線部)。その後も細胞は増え続け、約1週間でコンフルエントに達してからは、細胞は層を形成するように増えていく挙動が観察できた。加えて、17日経過時に、細胞培養ウェル内の過増殖状態にある細胞をLIVE/DEAD Cytotoxicity Kitを用いて染色(緑:生細胞、赤:死細胞)し、共焦点顕微鏡で蛍光画像取得し、細胞の生死判定を行った。ディッシュを用いた通常の培養では、COS-7細胞は、過増殖状態になると細胞間に接触障害が生じ、死細胞が増加するが、ウェル内の細胞は、ほとんどが細胞は生存していることが観察された。これは、点字セルによって、流路内を培地が常時強制的に還流し続けることで、細胞に対して常に生理的条件を満たす培地が供給されたためと考えられる。



図(5)-10. チップ内のウェル(直径1mm)に導入したCOS-7細胞の初期細胞数(播種密度)と増殖率(播種後4日間)との関係
縦線は、COS-7細胞の標準的な播種密度を示している。



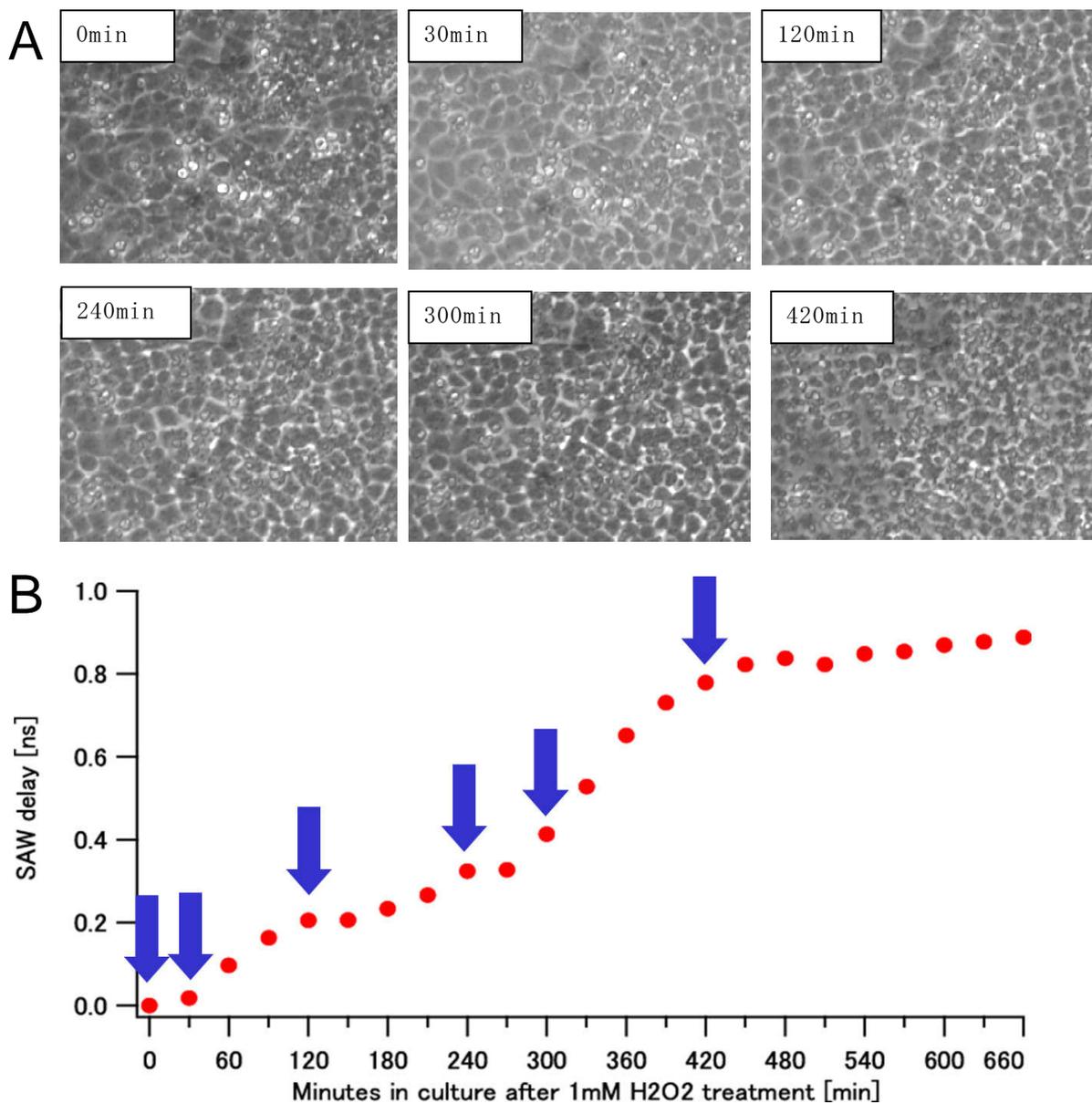
図(5)-11 微小流体下での COS-7 長期培養の位相差顕微鏡像と、蛍光による生死判定
 微小流路内の細胞培養ウェルに沈降・接着・増殖した COS-7 細胞は、生存・増殖し（1
 日目／5 日目），細胞塊を形成した（17 日目）。この細胞塊の大部分は、生細胞（緑）
 であることがわかる。

(2) SH-SAW による細胞のモニタリング能力の評価

1) 細胞の状態と SH-SAW 出力波形との関係

図(5)-12A に、SH-SAWダイの伝搬面（細胞CH）上に播種したSV40-T2細胞の経時変化を示す。0h~24hにかけて、細胞の接着ならびに増殖が認められる。H₂O₂添加後、時間経過に伴い細胞間の隙間が広がっているのが分かる。つまり細胞間の結合が徐々に崩壊していると言える。また、420minでは個々の細胞が収縮しているのが確認できる。

また、図(5)-12B に、培養時間経過にしたがうSH-SAW波形の伝搬速度の変化を、測定開始時の値との差で示した。縦軸(SAW delay)は、細胞が接着した伝搬面を通ったSH-SAWの出力波形のある1ピークに注目したときの、当該ピークの時刻と、初期状態におけるそれとの差（シフト量）である。正の値は、当該ピークが初期状態のそれより後に現われることを示しているため、正の値は、細胞の影響で遅延時間が増加していることを示している。図(5)-12B においては、H₂O₂添加後、遅延時間はほぼ単調に増加した。特に30~120min間と300min~420minにかけて、増加率が高くなった。図(5)-12A においても300minに対し420minでは、細胞が収縮している。この関係からも細胞間結合の破壊や細胞の収縮、剥離により、遅延時間が増加していると考えられる。



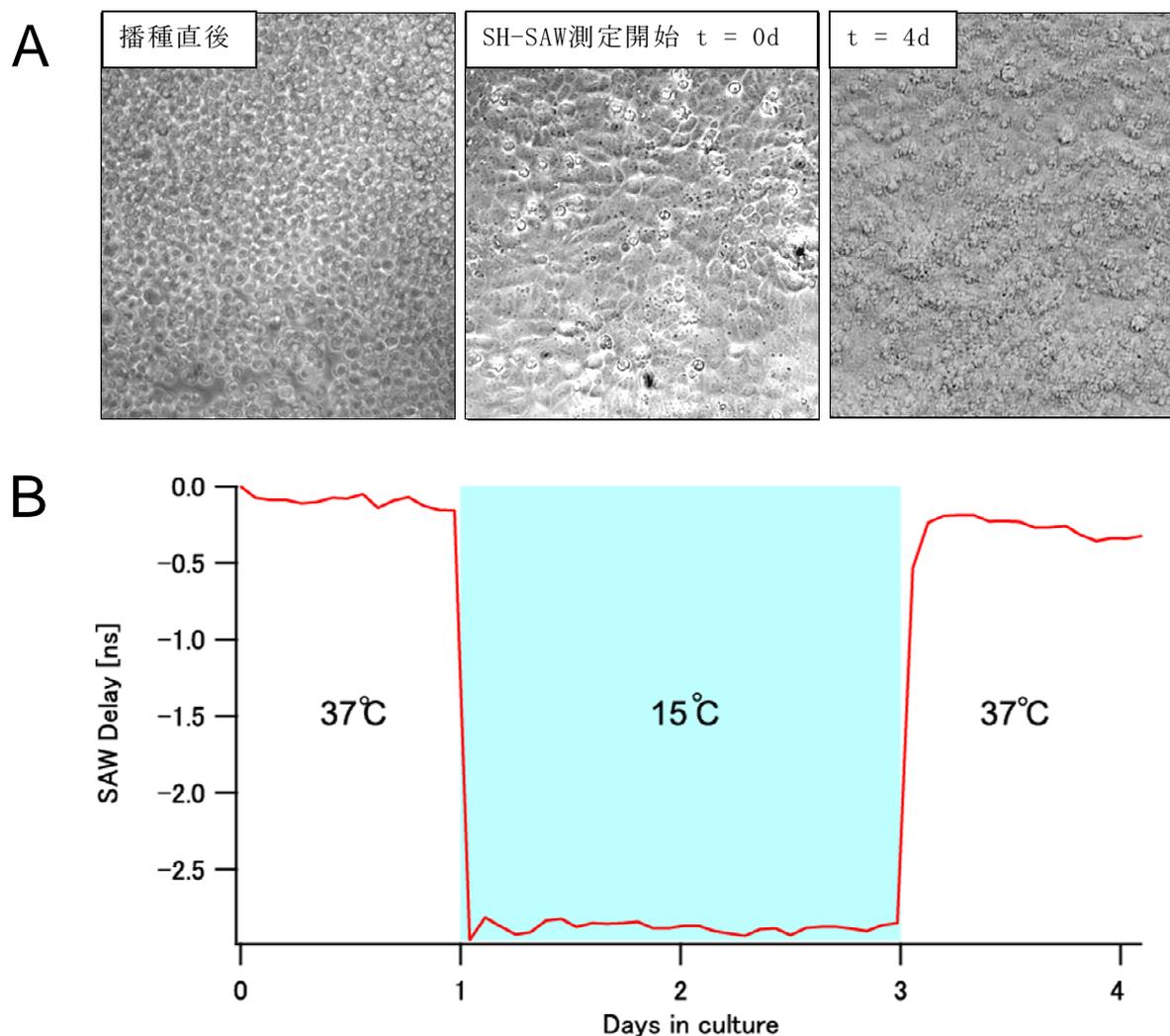
図(5)-12. SH-SAW伝搬面で培養維持されたSV40-T2細胞の培地に1mM（終濃度）の過酸化水素(H₂O₂)を添加した後の細胞とSH-SAW遅延時間の変化

A) H₂O₂添後の細胞の位相差顕微鏡写真。各パネルに記載の時刻は、H₂O₂添加後の経過時刻を示している。B) H₂O₂添加後のSV40-T2細胞の直下を伝搬したSH-SAWの遅延時間。図中矢印は、A)の各写真パネルに対応している。

2) 細胞とSH-SAW出力の低温輸送に対する耐性

図(5)-13A に、SH-SAW伝搬面でSV40-T2細胞を、37℃ならびに15℃でオンチップ・インキュベーションした際の位相差像を示す。T=0において単層を形成した細胞は、T=96hにおいて、増殖して重層していることが確認された。オンチップ・インキュベーションかつSH-SAW伝搬面上という非典型的な細胞培養条件においても、細胞は2日の常温輸送（低温ストレス）に耐性をもつことが示された。さらに、図(5)-13B に、オンチップ・インキュベーション中

のSH-SAW遅延時間の変化を示す。チップ底面 (=SH-SAW基板) の温度を15°Cに冷却すると、SH-SAWの伝搬速度は37°Cのそれよりも増大するため、冷却期間中は遅延時間は低減している。しかし、37°Cに復帰すると、あたかも15°Cの冷却期間がなかったかのようにSH-SAW遅延時間のトレンドは回復している。つまり、SH-SAW基板を搭載したオンチップ・インキュベーション・チップに細胞を播種し、輸送のために一時的温度を低下させても、SH-SAWを使った細胞間結合の評価が、輸送がないときと同様に行えるといえる。



図(5)-13. SH-SAW伝搬面で培養維持されたSV40-T2細胞とSH-SAW遅延時間の低温における挙動

A) 位相差顕微鏡写真。SV40-T2細胞を播種・培養開始後、細胞進展を待って t=0とし、SH-SAWの計測を開始した。t=4d は、37°C再加温後24時間後を示す。B) SV40-T2細胞が接着した圧電基板表面に沿って伝搬するSH-SAW伝搬波の到達時間。低温処理の期間中は見かけ上変化したがる、37°Cに戻ると低温処理前の状態に回復した。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

表面弾性波（SH-SAW）素子は、これまで電気信号回路での同調や発信等に使われていた。これらは、いずれも非水系での使用である。この発想を転換し、上皮細胞が平面状に連なることで形成した上皮組織を弾性波で振動させることで、その力学的構造を解析することに使えるのではないかと考え、本プロジェクトは開始された。その為には、①細胞培養培地中での使用に対応した素子や回路の無毒性の絶縁、②発信側楕円電極における効率的な一方向性SH-SAW伝搬波の受信側に向けた発信、③発生させた表面弾性波が極力エネルギー損失を少なく受信側に到達させる工夫、④表面弾性波の伝搬面と細胞－基質間接着分子との結合を取り持つインターフェースとしての擬似マトリックスの開発等が相まって、SH-SAWセンサは擬似マトリックスを介して接着している上皮組織による信号変調という形で測定できるまでになった。現在は、その安定性と感度を高めることに注力して地道な改良が行われている。

本サブテーマに関しては、SH-SAWバイオナノ協調体が、種々の環境化学物質や環境試料に対する生体影響評価や薬理学的研究に積極的に活用されるためには、周辺の培養装置をコンパクトにパッケージ化する必要があると考え、企画された。即ち、自らSH-SAWデバイスを製作して細胞培養可能にするための専門的知識と技能は、生体影響評価や薬理学的研究分野の研究者には馴染みが薄い。そこで、SH-SAWデバイスを、オンチップ・インキュベーション・システム（OCIS）に統合しSH-SAW肺胞上皮組織協調体OCISとすることで、SH-SAWデバイス上に肺胞上皮細胞を播種・培養した状態で生体影響評価や薬理学的研究分野の研究者に供給可能とすることを目指した。

このSH-SAW協調体OCISを用いることで、CO₂インキュベータ等の周辺装置を必要とせず、簡易なパネルヒータの加温のみで、過酸化水素による酸化的ストレスに対する組織傷害を第(2)章及び(3)章と同様に再現し、SH-SAWの信号変調として計測することができた。また、一旦流路内のSH-SAWデバイス上に播種された後は、上皮細胞は長期間安定して生存でき、例えば搬送中で起こるであろう低温曝露に対しても耐性がある。更に、SH-SAW協調体OCISは、外部のタンク・ポンプや配管を不要とするシステムであり、容易に滅菌状態を維持できるとともに、将来はメーカーで製造しユーザーの元に配送して毒性試験等に供することも可能なように考慮されている。これらの工夫によって、バイオナノ協調体を用いた健康影響評価という計測手法を、より現実的なものに改良できた。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

特に記載すべき事項はない。

<行政が活用することが見込まれる成果>

環境中に溢れている種々の化学物質によって組織や細胞が崩壊する現象は、甚大な公害に依る健康被害を除けば、通常は希有である。寧ろ、極微量の化学物質に暴露され続けることで、上皮組織の細胞－細胞間結合や密着結合が弱められ、結果外界からの異物の侵入リスクが高まる状況の方が、遙かに深刻である。しかしながら、この様な上皮組織としてのintegrityの弱体

化を正確に把握する検出手段が、現時点では無い様に思う。

本プロジェクトは、従来の抗体や酵素を用いた抗体型や酵素型バイオセンサの様に、単に特定物質の計測を行うのではなく、環境汚染物質や環境化学物質が生体に与える影響を「細胞や組織に対する機能的・構造的変化」として計測するための新たなカテゴリーのバイオセンサの確立から出発したが、2期目に入って、現実的な健康影響評価に役立てるように、アッセイ系の改良を行った。即ち、新規バイオセンサ（SH-SAWバイオナノ協調体）を、微小流体デバイスに統合することで、

①SH-SAWバイオナノ協調体の製造者と、アッセイする試験者とが分離できるようにする。

即ち、健康影響評価を行う試験者が、自らバイオナノ協調体を作製する必要性は消失した。

代わって、メーカーが一定の品質管理のもとにバイオナノ協調体を製造して、試験者に安定供給することが可能になった。

②製造者から試験者の元にバイオナノ協調体が支障無く搬送できる為に、搬送中でも滅菌状態の維持、低温に対する耐性を確保することで、試験者の元に配送された後バイオナノ協調体として機能できるように、微小流体デバイスの設計を行った。

③SH-SAWバイオナノ協調体の作製と信号計測には、高度の技能と知識を必要とする。今回、微小流体チップを用いたオンチップ・インキュベーション・システムにパッケージできたことで、基礎的なトレーニングを受けるだけで、取り扱えるように改善できた。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) 二井信行, 高野温, 宮下三佳, 田中真人: 生体医工学, 47, 6, 529-534 (2009) 「ポリジメチルシロキサン隔膜を介した水分・ガス交換による微小流体細胞培養デバイスのオンチップCO₂インキュベーション」
- 2) A. TAKANO, M. TANAKA and N. FUTAI: Microfluid. Nanofluid, 12, 6, 907-915 (2012) “On-chip CO₂ incubation for pocket-sized microfluidic cell culture. ”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 高野温, 宮下三佳, 田中真人, 二井信行: 生体医工学シンポジウム2009, 千葉 (2009) 「ポリジメチルシロキサン隔膜を介した水分・ガス交換による微小流体細胞培養デバイスのオンチップCO₂インキュベーション」
- 2) 高野温, 田中真人, 二井信行: 第22回化学とマイクロ・ナノシステム研究会(22nd CHEMINAS), 名古屋 (2010)

- 「微小流体チップの完全閉空間オンチップインキュベーションの評価」
- 3) A. TAKANO, M.MYASHITA, M.TANAKA and N. FUTAI: 10th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM 2010), Hong Kong, (2010)
“Microfluidic cell culture with simplified on-chip CO₂ incubation.”
 - 4) 滝澤 和也、高野 温、今 大健、上原 篤詞、貝沼 美帆、古屋 泰文、持立 克身、田中 真人、二井 信行：生体医工学シンポジウム2011 (2011)
「表面弾性波素子の微小流体細胞培養チップへのパッケージング」
 - 5) A. TAKANO, T. OGAWA, M.TANAKA and N.FUTAI: 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '11), Boston, MA, USA (2011) "On-chip Incubation System for Long-term Microfluidic Cell Culture."
 - 6) 高野温, 田中真人, 二井信行：日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2011, 東京 (2011)
「マイクロ流体下での長期細胞培養のためのオンチップCO₂インキュベーション」
 - 7) A. TAKANO, K.TAKIZAWA, T. KON, M. TANAKA, Y. FURUYA, N. FUTAI: 1st Progress and Innovation of Smart Materials and Related Technology (PI-SMART2012), Hirosaki, Aomori, 2012
“SAW chip-equipped microfluidic platform for cell-based biosensing.”
 - 8) 二井信行：PI-SMART in 仙台(2012)
「SH-SAW+マイクロ流路の結合型バイオセンサ」
 - 9) 柴田昌宏, 相澤典男, 高野温, 大鳥秀貴, 今大健, 古屋泰文, 持立克身, 田中真人, 福井康裕, 二井信行：生体医工学シンポジウム2012 (2012)
「培養細胞単層の粘弾性測定の横波表面弾性波による計測」
 - 10) 相澤典男, 柴田昌宏, 高野温, 福井康裕, 田中真人, 二井信行：生体医工学シンポジウム2012 (2012)
「マイクロ流体チップへの細胞播種自動化プロセス」
 - 11) N. FUTAI: 5th International Conference on Biosensors, Biochips, and Bioelectronic Devices (BIOTRONICS2012), Gwangju, Korea, 2012
“All-in-one Pocket-sized Long-term Cell Culture System Using Braille-based Microfluidics and On-Chip CO₂ Incubation.”
 - 12) 高野温, 柴田昌宏, 大鳥秀貴, 今大健, 古屋泰文, 持立克身, 福井康裕, 田中真人, 二井信行：日本生体医工学会関東支部若手研究者発表会2012 (2012)
「オンチップCO₂インキュベーション下で培養した細胞の表面弾性波による挙動解析」
 - 13) A. TAKANO, S. INOMATA, T. OGAWA, N. FUTAI, M. TANAKA: American Society for Cell Biology (ASCB) 2012 Annual Meeting, San Francisco, CA, USA (2012)
“Applications of the microfluidic cell culture system with on-chip CO₂ incubation for cell biology.”
 - 14) A. TAKANO, M. TANAKA, N. FUTAI: 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Osaka, Japan (2013) (accepted)

"Microfluidic cell culture system with on-chip hypoxic conditioning."

(3) 出願特許

- 1) 二井信行, 田中真人, 持立克身: マイクロ流体チップ及び細胞の培養方法, 特開2011-206045, 2011. (公開)

(4) シンポジウム、セミナー等の開催 (主催のもの)

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

- 1) 生体医工学シンポジウム2009 (2009)における受賞: ベストリサーチアワード
- 2) 33rd Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (EMBC '11), Boston, MA, USA (2011)における受賞: Student Paper Competition Finalist と Philips Young Investigator Award (PYIA) Finalist
- 3) 二井 信行: 科学技術振興機構(JST) サイエンス・パートナーシップ・プログラム(SPP) 講座型学習活動支援 (プランA) 講師, (2012)
「マイクロ流体チップを用いた細胞培養実習」

8. 引用文献

- 1) N. FUTAI, W. GU, J. SONG, S. TAKAYAMA: Lab Chip, 6, 149-154 (2006) "Handheld recirculation system and customized media for microfluidic cell culture."

Development of Artificial Tissue-Nanodevice Sensor Complex for Versatile Application to Risk Assessment of Health

Principal Investigator: Katsumi MOCHITATE
Institution: Center for Environmental Health Sciences
National Institute for Environmental Studies (NIES)
16-2 Onogawa, Tsukuba, Ibaraki 305-8506, JAPAN
E-mail: mochitat@nies.go.jp

Cooperated by: Hirosaki University and Tokyo Denki University

[Abstract]

Key Words: Chemical matrix, SH-SAW, Alveolar epithelial cell, On-chip incubation

The risk control of environmental pollutants is fundamental for protection of the public health, and the monitoring for complex exposures by pollutants is essential for the risk assessment of health. However, the traditional monitoring limited to the marked pollutants has not been always enough for surveying the risk, so that we have experienced environmental pollutions in the past. So long as we would persist in assessing the health risk by monitoring the only identified pollutants, we might have to prepare another pollution again by unidentified or unrecognized substances that were unexpectedly or unintendedly produced in or leaked into our environments.

Taking account of the limitation of the traditional monitoring system, a complementary monitoring model is needed that is based on biological effects rather than on chemical or physical detection. The biological tissues that were injured by environmental pollutants might be available for the biological detection of the pollutants, if electric devices could respond to these kinds of injuries.

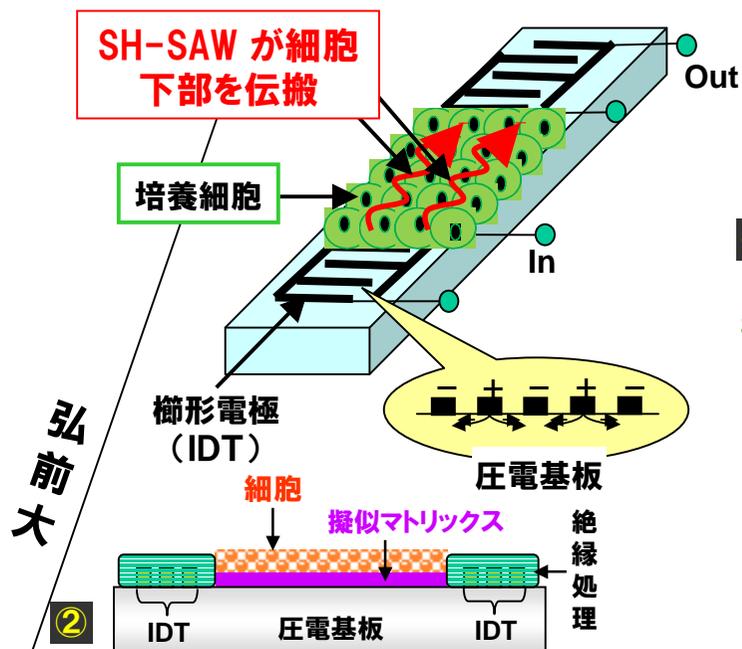
The first step to develop a novel type of biosensor is to reconstruct an artificial tissue on an electric device and to hold the tissue integrity during the whole period of culture in monitoring. For this purpose we have invented chemical matrices, Pseudomatrices (US Patent No. 8304238) that can work as an interface between a tissue layer and an electric device. By the simple coating of a device with Pseudomatrix the seeded cells can adhere and grow on the device as if they were cultured on plastic culture wares.

The second step is to make a right choice from the candidates of electric devices. A shear horizontal-surface acoustic wave (SH-SAW) device appears to be one of hopeful devices, such as NO sensing by PMP complex and H₂O₂ sensing by GaAs 2DEG-FET semiconductor. A SH-SAW device has the characteristics that it is able to respond to the electrical permittivity and conductivity as well as mechanical viscosity and density. The

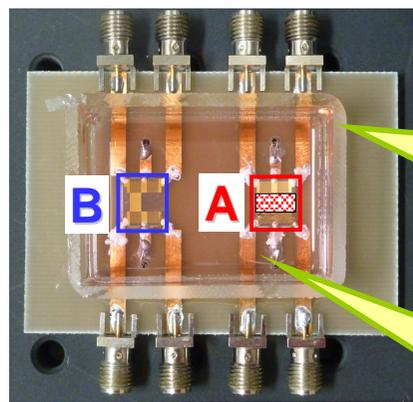
former characteristic may change with caused by the collapse of cell-cell junction and the latter may shift depending on the detachment of injured tissue by the pollutants. We have improved the IDT-electrode for lowering insertion loss and ripple for the cell culture on the surface of SH-SAW device.

Third, we have developed an on-chip CO₂ incubation system (OCIS) based on mass/heat transfer from aqueous solutions of bicarbonate solution to culture medium through a permeable poly(dimethylsiloxane) (PDMS) wall. Alveolar type 2 epithelial cells seeded on the SH-SAW device equipped in OCIS could grow normally and the modulated SH-SAW signal by the cell layer was monitored.

人工組織ナノデバイスセンサー複合体を活用した多角的健康影響評価システムの開発



SH-SAW バイオナノ協調体



A: 細胞の変化を測定
B: 溶液や温度の変化を測定

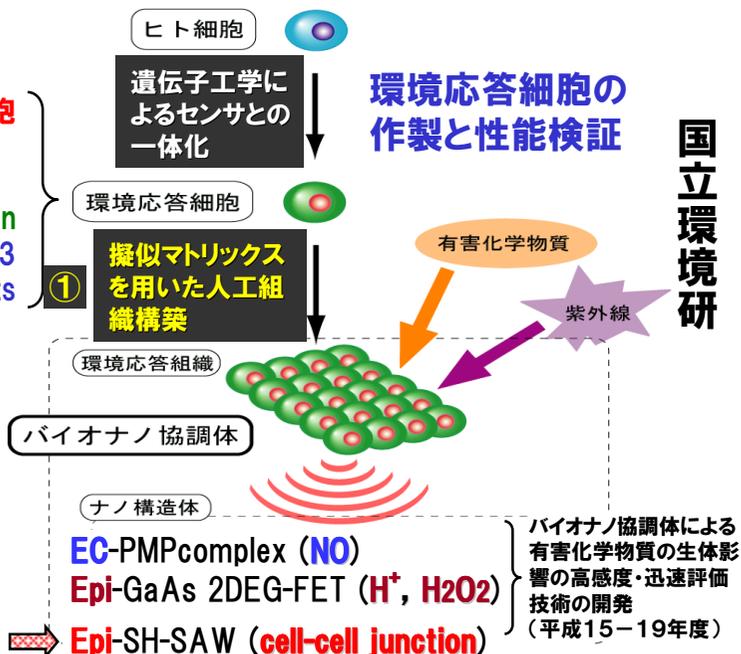
プール
培養液保持
のためアク
リルで作製

絶縁処理
伝搬部以外をPDMS
(ホリジメチルシロキサン)
によりコーティング

開発

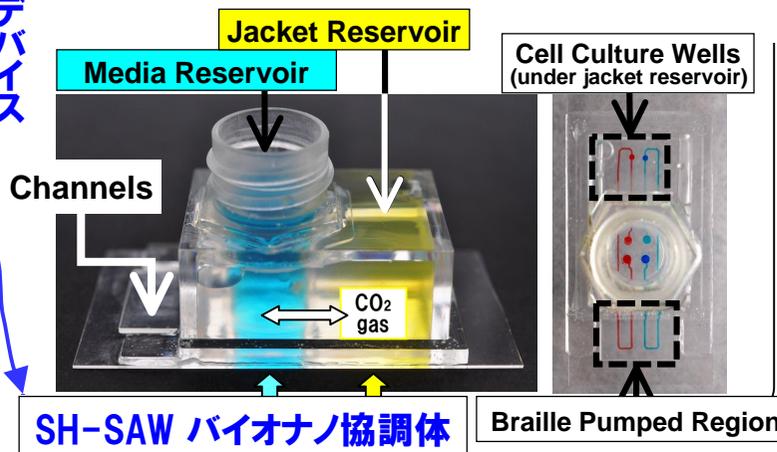
④ 肺胞上皮細胞 (SV40-T2), Syndecan-2, SN2 & E-cadherin transfected 293 recombinants

バイオナノ協調体の作製



国立環境研

③ 微小流体デバイス



東京電機大