

博士論文

糸球体及び尿細管の機能を模倣した
マイクロ腎排泄モデルの開発

物質・生命理工学領域

平成 26 年度博士課程入学

氏 名 作田 悠

指導教員名 佐藤 記一

1-1 新薬開発

- A) 新薬開発の開発過程
- B) バイオアッセイ
- C) 薬物動態

1-2 マイクロチップ

- A) マイクロチップの発展と生命科学への応用
- B) マイクロチップ内での細胞実験
- C) マイクロチップを用いた臓器モデルの開発

1-3 腎排泄

- A) 腎臓の構造と機能
- B) 薬剤の腎排泄
- C) 腎排泄の試験法

1-4 マイクロチップを用いた腎臓モデルの開発

1-5 本研究の目的

2-1 マイクロチップの基板材料

2-2 鋳型の作製

- A) フトリソグラフィーによる鋳型の作製
- B) 裏面照射法による厚膜の鋳型の作製

2-3 チップの作製

- A) PDMSシートの作製
- B) 両面に流路が造形してある PDMS シートの作製
- C) PDMS 薄膜の作製
- D) PDMSシートの貼り合わせ

2-4 マイクロチップへの送液

2-5 細胞培養

- A) MCF-7 細胞
- B) Caco-2細胞
- C) 培地
- D) 細胞培養のためのマイクロチップの前処理
- E) 細胞懸濁液の調整
- F) マイクロチップでの細胞培養

2-6 抗がん剤

- A) 抗がん剤
- B) 抗がん剤の活性評価

2-7 測定装置

2-8 イヌリンの定量

2-9 透過係数の算出

2-11 透過係数の算出

第3章 集積化マイクロ糸球体モデルの開発

47

3-1 序論

3-2 集積化糸球体モデルの設計

3-3 集積化モデル作製のための基礎検討

- A) 液漏れ防止流路の設計
- B) 液漏れ防止流路のための鋳型の作製
- C) PDMS プレポリマーの導入による液漏れ防止の検討
- D) SU-8 の導入による液漏れ防止の検討
- E) 流路が隣接する事に対する問題点と対策

- 3-4 集積化モデルの作製
 - A) 鋳型の作製
 - B) 集積化モデルの作製

- 3-5 集積化モデルでの実験系の構築
 - A) 送液系及びマイクロポンプ駆動系の構築
 - B) 並列化のための配線の改良

- 3-6 マイクロポンプによる流速制御と循環流路の並列循環
 - A) マイクロポンプの原理と課題
 - B) 流速の測定

- 3-7 集積化モデルでの並列した透析実験

- 3-8 集積化マイクロ糸球体モデルを用いた抗がん剤のアッセイ
 - A) アッセイの原理
 - B) 集積化モデルの培養槽での MCF-7 細胞の培養
 - C) 抗がん剤アッセイの評価
 - D) 単一モデルとの抗がん剤アッセイの比較
 - E) 集積化モデルでのアッセイの評価

- 3-9 実用的なアッセイへの課題
 - A) マイクロポンプのポータブル化
 - B) 人体の腎排泄に近づけるための課題

4-1 序論

4-2 マイクロ糸球体モデルでのイヌリンの定量

- A) イヌリン
- B) イヌリン定量チップの設計・作製
- C) イヌリンの検量線の作成
- D) チップから排泄されたイヌリンの定量

4-2 透析部の再設計

- A) 設計方針
- B) 透析部を拡大したチップの作製と問題点

4-3 蛇行モデルの開発

- A) 設計
- B) 膜の挟み込み方法の変更
- C) 蛇行モデルでの透析実験
- D) 消失速度定数の解析

4-4 結論

5-1 序論

5-2 尿細管の機能を模倣した部位の基礎検討

- A) 再吸収モデル、分泌モデルの設計と原理
- B) 再吸収モデル、分泌モデルへのモデル細胞の培養
- C) チップ内での細胞の長期培養
- D) Rh123 の能動輸送の確認

5-3 マイクロ腎排泄モデルの開発

- A) マイクロ腎排泄モデルの概略
- B) マイクロ腎排泄モデルの設計
- C) マイクロ腎排泄モデルの作製
- D) 細胞なしでの透析実験
- E) 分泌部での細胞培養
- F) マイクロ腎排泄モデルでの排泄実験（透析＋分泌実験）

5-4 結論

1 章 序論

1-1 新薬開発

A) 新規薬剤の開発過程

新薬開発では、その初期段階に莫大な数の薬剤候補化合物の中から薬効の強いものが選抜され（リード化合物）、類似化合物が多数合成される。これらの候補化合物について、薬物動態に関わる細胞膜透過性や代謝酵素による代謝速度など、数多くの項目について、様々な *in vitro* 実験系を用いて検討がなされる。それらの結果として得られる各種パラメータを比較し、候補化合物の数が絞りこまれ、前臨床試験（動物実験）を経て、後の臨床試験に導入する化合物を決定する。

このようなプロセスを経て、候補化合物が市場へと出るまでに必要な研究開発期間は 10 年～15 年、費用は平均で約数百億円と言われており[1]、その効率化や低コスト化が求められている。しかし、現在においても臨床試験に至って、前臨床試験で期待されたほど薬効が出ないことや、副作用の出現、薬物動態特性の悪さなどを理由にドロップアウトする薬剤が数多くある[2,3]。臨床試験には非常に多額の費用を必要とするため、臨床試験に至るまでの段階で、ヒトにおいて理想的な薬効を示す化合物を選定できるバイオアッセイ法が必要とされている。

B) バイオアッセイ

バイオアッセイとは、生物材料を用い、その生物学的応答から生理活性の強さを評価する方法であり、日本語では生物学的検定法、生物学的（毒性）試験などと呼ばれている。生物材料の具体的なものとしては脊椎動物、無脊椎動物、植物、藻類、細菌、酵母など個体レベルのものから培養細胞、単離細胞などの細胞レベル、更には細胞内小器官までが用いられている。

バイオアッセイでは化学物質の量を測定する物理化学的分析手法では得られない様々な情報を、生理活性から得ることができるため、薬学や医学の分野では、ヒト体内での薬物動態を研究するツールとして動物実験や培養細胞でのバイオアッセイが重要視されている。

C) 薬物動態

薬物動態とは、吸収 (Absorption) ・分布 (Distribution) ・代謝 (Metabolism) ・排泄 (Excretion) という薬物の生体内における一連の移行と変化の過程であり、英語の頭文字をとって ADME と称される (図 1-1)。

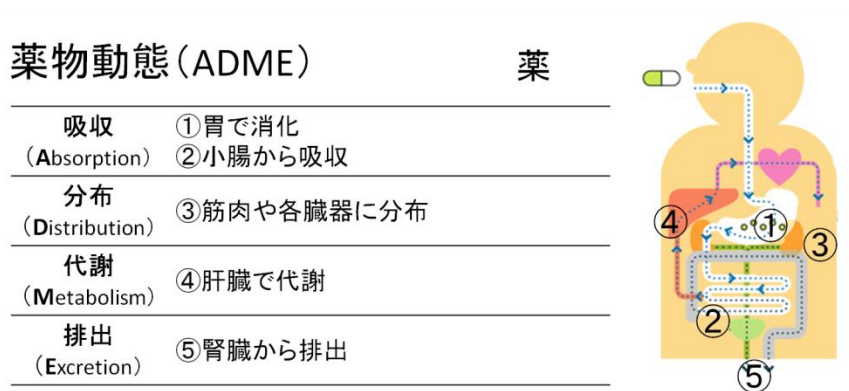


図 1-1 薬物動態

吸収とは主に経口摂取した物質が小腸から毛細血管へ移行する過程である。腸の上皮細胞はお互いにタイトジャンクションで結合しており、腸管内の物質が体内へ自然には入り込まないようにになっている。腸上皮細胞はその頂端側 (腸管側) と基底側 (血管側) で異なる膜タンパク質を有し、頂点側には特に数多くのトランスポーターが発現して能動的に物質を輸送するため、薬剤の体内への吸収に深く関わっている。

分布とは吸収された薬剤が体内循環する間に様々な臓器や筋肉、脂肪組織などに蓄積される過程の事であり、薬剤が標的へと作用する濃度や体内への残留性などに大きく影響する。

また、代謝とは肝臓へと輸送された物質が P450 をはじめとする様々な代謝酵素によって分解、あるいは排泄を促進するために他の分子を付加させられる過程の事で、薬効などに大きく影響する。

排泄とは腎臓の糸球体で限外濾過されて尿細管で再吸収・分泌を受けた後に尿として体内から消失していく過程であり、薬剤の残留性に大きく影響する。

このような、吸収・分布・代謝・排泄の 4 過程は摂取した物質の体内における濃度と密接に関係があるため、投与量やその方法、頻度などを決定する上で重要なパラメータとなる。投与量に関しては、体内での濃度が不十分であれば期待される効果を発揮することが出来ず、逆に過剰量摂取しても重篤な副作用を及ぼす可能性がある。また、体内からの排泄量に関しては、残留性の高い物質は概ね高濃度になりやすく、やはり副作用を及ぼす可能性がある。

薬物動態を評価するため、*in vitro* あるいは *in vivo* で様々な試験が行われている。物質の体内への吸収を評価するためには、腸上皮様細胞をセルカルチャーインサート上に培養した系が用いられ、物質の代謝を評価するためには代謝酵素を発現させた肝由来細胞などを含む臓器モデルを用いた実験が行われる。分布および排泄はマウスなどを用いた動物実験が主流であるが、排泄に大きく関与する血漿タンパク質結合率などのパラメータは *in vitro* 実験でも調べられている。(表 1-1)

表 1-1 薬物動態の試験法

薬物動態	試験法
吸収	腸上皮由来細胞を用いた実験
分布	マウスを用いた動物実験
代謝	臓器モデルを用いた実験
排泄	マウスを用いた動物実験、血漿タンパク質結合率

そのような中で近年、動物実験は薬効や副作用に関するヒトと実験動物との種差や、高いコスト、動物愛護などの観点から大幅に削減されている[4]。それに対して、培養細胞を用いたバイオアッセイは、動物実験に比べて倫理的に優れており、研究にかかるコストを削減できるなどの利点を有する。そのため、近年では培養細胞を用いて薬物動態を評価する方法の開発が盛んに行われており、培養細胞をよりヒトの体内に近い環境で培養してバイオアッセイを行う事ができるマイクロチップを用いた研究も、その1つとして注目され始めた。

1-2 マイクロチップ

A) マイクロチップの発展と生命科学への応用

マイクロチップとは数 cm 角の基板内部に 100 μm オーダーの流路を作製したデバイスであり、その中に溶液を流しながらさまざまな化学プロセスを行うことが可能である (図 1-2)。近年、分析化学を始め、様々な分野で世界的に研究が進められている[5]。

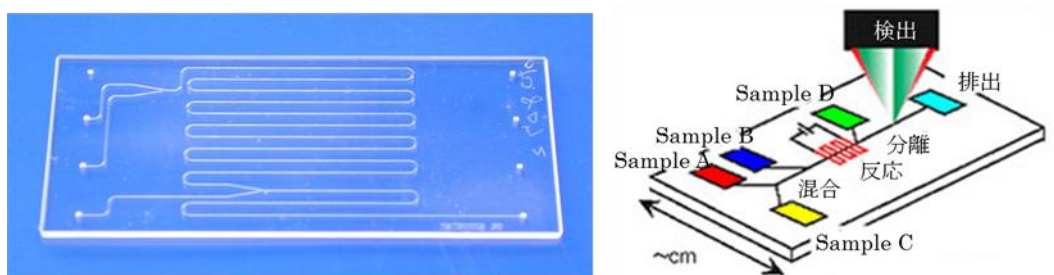


図 1-2 マイクロチップの一例[5]

このような基板上に構築した微細流路を利用して化学分析を行う研究は、1970年代にスタンフォード大学の Terry らが開発したシリコン基板上のガスクロマトグラフィーシステムに関する研究から始まった[6]。その後 1990年代には Manz らによって、微細加工を施した基板上ですべての分析操作を行う Micro Total Analysis System (μTAS)が提唱され[7]、それ以来マイクロチップの化学分析分野への実用化に向けた研究が急速に発展し、その一部が製品化されるまでに至った。これまで、DNA の電気泳動を始めとして[8]、微粒子のサイズ分離[9]、光導波路への応用[10]などマイクロチップは様々な分野で応用され始めており、近年では生命科学分野での研究が盛んである。マイクロチップでは超微量の物質を扱うことができるために、試料が高価、あるいは少量しか入手できない場合などに大きな効果を発揮する。

特に、細胞を用いた実験ではチップ内に細胞培養槽と化学反応部、分離部、検出などを組み込むことができるために、一枚のチップ上で高度な分析を実現することも可能である。つまり、培養する細胞と組み合わせる分析方法を変えることによって、様々な研究に応用することが可能であり、汎用な技術となることが期待されている。

B) マイクロチップ内での細胞実験

通常、培養細胞を用いた研究には直径数 mm のウェルが並んだマイクロタイタープレートと呼ばれるポリスチレン製の容器、あるいは直径数 cm のシャーレといった容器を用いる。このサイズは人間から見て取り扱いやすいという基準で決められているものであり、細胞にとっては不必要に大きな空間である。それに比べてマイクロチップでは数十 μm から数百 μm オーダーサイズの流路内で細胞を培養する。培養空間が細胞の大きさにより近いサイズであるため、微量の細胞を扱うのに適したデバイスと言える。また、細胞培養実験をチップ内で行う利点として、反応空間が狭くなるために細胞や培地などの微量化が図れることや、細胞から放出された物質が大量の培地で希釈されてしまう影響が少なくなること、流路を繋ぐことによって複数のプロセスの集積化が可能となる事などが挙げられる。このような利点を活かした細胞実験デバイスの開発研究は 2000 年頃から行われてきた。

マイクロチップ内での細胞実験は、フローサイトメトリーやセルソーターなど細胞を懸濁状態のまま扱う手法や、細胞懸濁液を界面活性剤と混合することなどによって細胞を破碎、抽出し、溶出物の分析を行うものが初めに研究された[11]。フローサイトメトリーとは細胞懸濁液など溶液中に存在する粒子の大きさや蛍光強度などを測定する分析法で、細胞懸濁液に含まれる特定の種類の細胞の数を測定するなどの目的に用いられる。セルソーターはそれに分離装置を組み合わせたもので、特定の種類の細胞だけを分離回収できるようにしたものである。

その後、流路内に培地を供給し続けることでマイクロチップ内での長期間の細胞培養が可能となり、それに続いてマイクロチップ内での様々な細胞培養技術が研究された。Sato らはチップ内での細胞培養を開拓し、チップ内で培養した神経細胞から分泌される分子の直接検出に成功した[12]。

また、チップ内に培養した細胞からの放出物質に基づいたバイオアッセイの研究も行われた。例えば Goto らはチップ内にマクロファージを接着培養し、リポ多糖刺激によって放出された NO 濃度の経時変化を測定することにより、免疫刺激物質のバイオアッセイを実現した[13] (図 1-3 図 1-)。また、Tokuyama らは浮遊細胞である肥満細胞をチップ内に培養し、放出されたヒスタミンの測定に基づく抗アレルギー薬のスクリーニングを行った[14]。これらはいずれも細胞からの放出物をチップ内でそのまま化学反応させ高感度検出することを実現しており、従来法では実現できないチップならではの分析手法といえる。

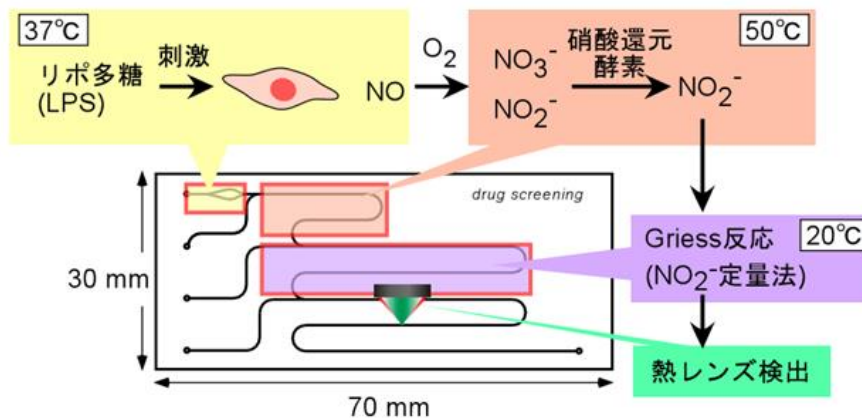


図 1-3 細胞から分泌された NO の検出[13]

一方、細胞培養部についても従来のディッシュやフラスコでは実現できないような培養環境の構築が試みられている。例えば、チップ内の微小空間での細胞のパターニングや[15]、流れや物質の濃度差ある環境での細胞培養など、体内における臓器の周辺環境を模倣するような研究が進められている。

近年では、マイクロチップ内に特定の臓器の環境や機能を模倣した臓器モデルの開発や、それを用いたバイオアッセイの研究が世界的に注目を集めている[14]。このようなマイクロチップは **Organ-on-a-Chip** と呼ばれ、これまでに様々な臓器モデルが開発されてきている。

C) マイクロチップを用いた臓器モデルの開発

マイクロチップを用いた臓器モデルとして代表的な研究を表 1-2 に示す。肺のモデルでは、Huh らがエアロゾル化した薬剤の肺から血管へと吸収される過程を模倣したマイクロチップを開発した[16] (図 1-4)。このモデルでは多孔質膜の上面に肺胞の上皮細胞を、下面に血管内皮細胞を培養し、側面流路を吸引する事で肺胞の伸展運動を模倣した培養を実現した。また、肝臓のモデルでは、Allen らがチップを用いて肝小葉の帯状の構造における、物質の濃度勾配などを再現している[17]。このようなマイクロチップを用いた臓器モデルは、その臓器での疾患を細胞レベルで分析できる事や、細胞にせん断応力などのストレスを与える事で細胞の分化を促進できる事が利点となっており、医療や薬学分野での応用を目指して研究が盛んに行われている。

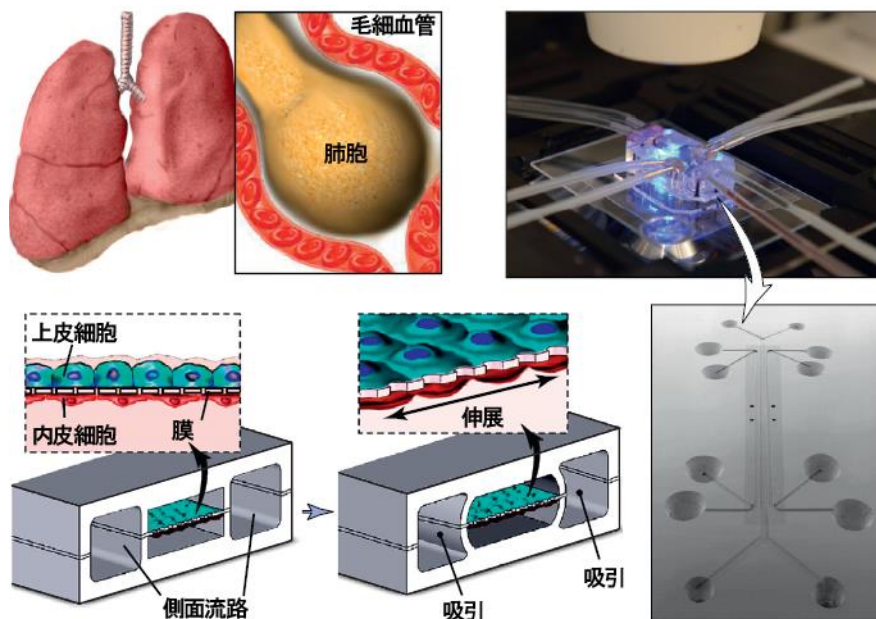


図 1-4 マイクロ肺モデル[16]

表 1-2 マイクロチップを用いた臓器モデル

臓器	模倣した臓器の特徴	文献
肺	肺胞の伸展、血管-肺の組織界面	[16]
肝臓	帯状の構造	[17]
腸	小腸の吸収、絨毛の構造	[18][19]
骨髄	造血細胞付近の微小環境	[20]
血管	血管新生	[21]
脳	血液脳関門の構造	[22]

様々な臓器モデルが開発されていく中で、複数の臓器モデルやプロセスをチップに集積する事により、吸収・分布・代謝・排泄などの過程を1枚のマイクロチップ上に集積化してバイオアッセイを行うことを目指した、**Human-on-a-chip** と呼ばれる概念が提唱され、薬物動態の研究や動物実験の一部代替となるツールとして期待されている（図 1-5） [23,24]。このような研究を実現するためには上記で示した単一の臓器の固有の機能を模倣する事に加えて、複数の部位で薬剤を設計通りに処理するための流路構造や流体操作、薬剤の移行過程の測定などが必要になると考えられる。

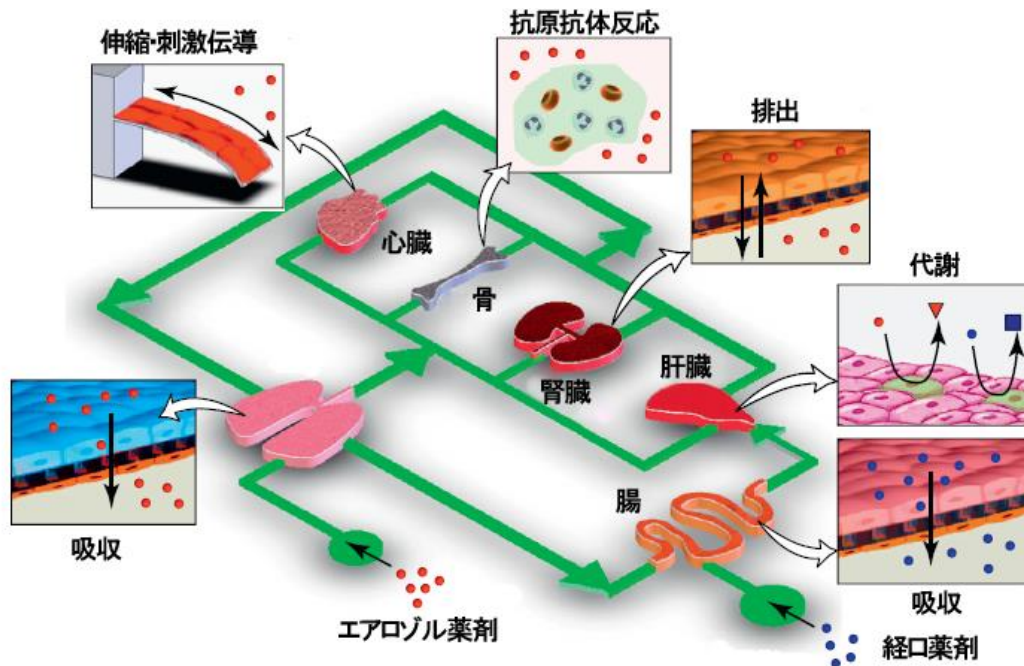


図 1-5 Human-on-a-chip の概念図[26]

Human-on-a-chip を目指した集積化の研究の例としては、経口投与した抗がん剤が受ける消化・吸収・代謝の過程を一枚のチップ内に集積した Imura らの抗がん剤アッセイ[25]や、培地が循環するチップ内で小腸、腎臓、皮膚生検、肝臓スフェロイドを 14 日間共培養した Maschmeyer らの研究[26]などが挙げられる。しかし、複数の過程を組み込んだ実験系の構築及びその計測は技術的に困難であるため、研究例の報告は非常に少なく、チップ内での吸収、代謝過程の集積化の概念実証や、複数の臓器細胞を共培養した際の相互作用の確認に留まっている。特に、腎臓の排泄部位の開発は、薬剤の消失過程に関わる重要な過程にも関わらず、薬剤をチップ外へと排泄できる高度な排泄部位の研究はほとんど無い。従って、Human-on-a-chip 実現に向けた研究において、高度な腎排泄部位の開発は非常に重要であると考えられ、本研究では腎排泄に着目して研究を行うこととした。

1-3 腎排泄

A) 腎臓の構造と機能

腎臓は血液中の老廃物を尿として排泄することにより、体液組成の調整などを行う臓器である[27]。ヒトの体には横隔膜の下に左右1対存在しており、右側には肝臓があるため、右の腎臓は左の腎臓に比べて3 cm程下に位置している。それぞれの腎臓は長さ12 cm程、重さ150 g程のソラマメ形をしており、腎動脈、腎静脈、尿管などが入り出している。腎動脈は腎臓の内側の髄質から外側の皮質にかけて徐々に弓状動脈や小葉間動脈などの細い動脈を経て腎静脈へ繋がっており、腎臓内には尿生成を担っているネフロン（腎単位）と呼ばれる腎小体と尿細管で構成される単位が左右合わせて200万個存在している[28]。腎小体は毛細血管が毛玉状の構造を作っている糸球体と、尿細管の末端が糸球体を覆っているボウマン嚢の2つで構成され、尿細管はボウマン嚢を出て皮質内で迂曲した近位尿細管①、髄質を直線的に一往復しているヘンレのループ②、再び皮質で迂曲する遠位尿細管③、遠位尿細管が合流する集合管④での4つで構成されている（図1-6）。

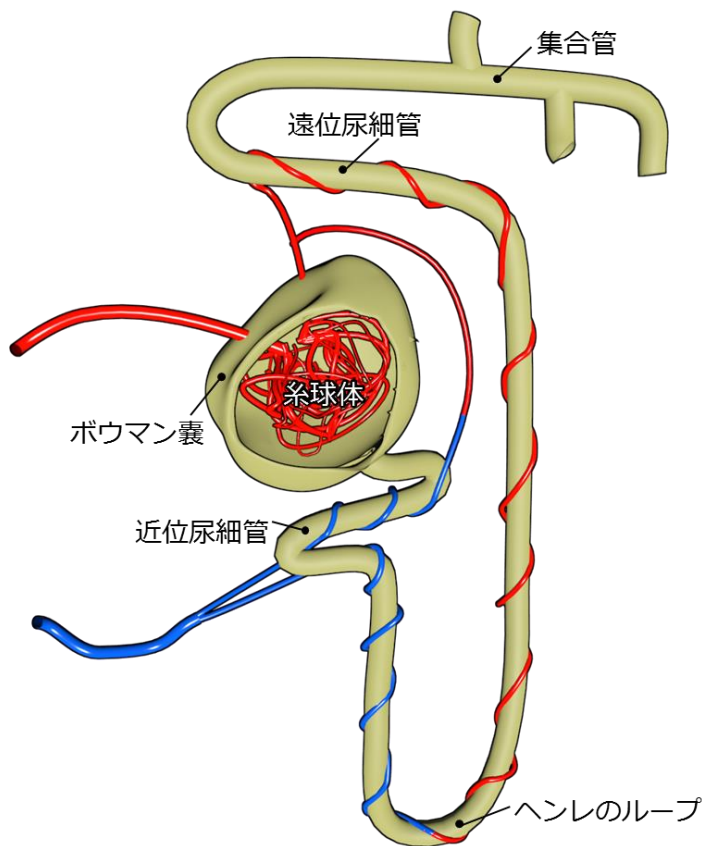
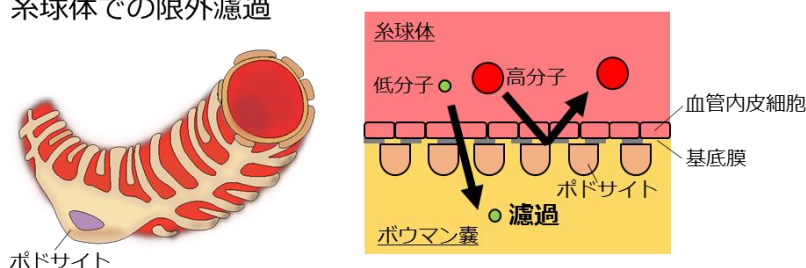


図 1-6 ネフロンの構造

血液は輸入細動脈から腎小体に入ると糸球体と傍尿細管毛細血管の2つの毛細血管網を通過して腎静脈へと流れて体内循環し、原尿はボウマン嚢から尿細管を経て尿管へと排泄される。ネフロンでは糸球体で限外濾過の過程で老廃物の排泄を行い、尿細管での再吸収・分泌の過程で体液組成の調整を行っている。

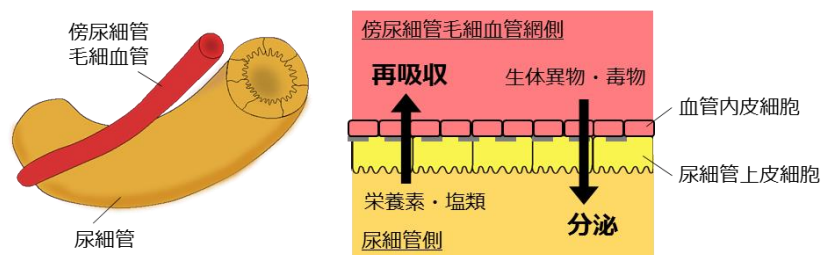
糸球体は内皮細胞を外側から基底膜とポドサイトによって覆われた構造をしており、ポドサイトの足突起と基底膜によって濾過障壁を作る(図1-7-a)。高い血圧とこれらの濾過障壁によって、糸球体は血液から水と低分子化合物のみを原尿として効率的に送り出している。尿細管は単層の尿細管細胞の管状構造をしており、その周囲に存在する毛細血管と能動輸送・受動輸送を行っている(図1-7-b)。ここでは、濾過されたグルコースなどの栄養素や Na^+ イオンを血管側に取り込む再吸収と、毒性のある異物を尿細管側に排泄する分泌が起こり、トランスポーターを介した能動輸送は、主に近位尿細管で行われ、濃度勾配による受動輸送はヘンレのループと遠位尿細管で行われている。

(a) 糸球体での限外濾過



血圧と濾過障壁のサイズ分離による老廃物の濾過

(b) 尿細管での再吸収・分泌



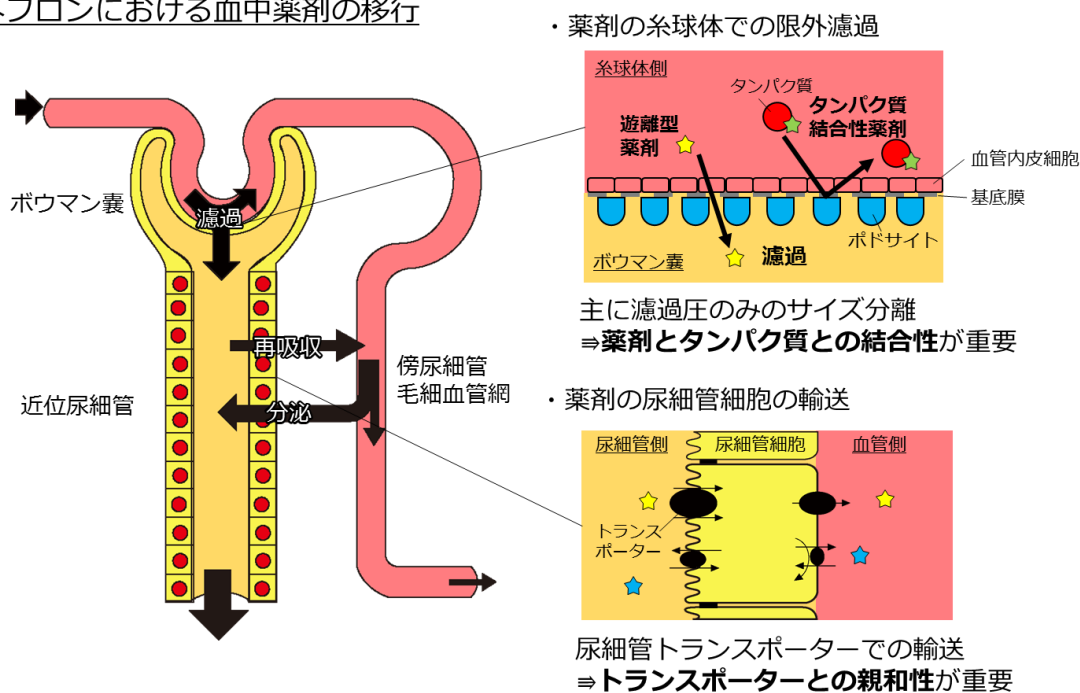
再吸収と分泌による体液組成の調整

図 1-7 糸球体、尿細管の機能と構造

B) 薬剤の腎排泄

A) で述べたように、薬剤は糸球体での限外濾過で排泄され、近位尿細管での再吸収・分泌の過程を受ける。糸球体での限外濾過の過程は、主に濾過圧によって行われている。糸球体ではポドサイトと基底膜で形成された濾過障壁が分子量 50,000 以上の高分子を通さないため、血漿タンパク質と結合しやすい結合性の薬剤は糸球体で濾過されず、体内に残留しやすい。一方で、タンパク質に結合せず遊離して存在している血漿タンパク質非結合型の薬剤は糸球体で濾過されて速やかに体外へと排泄される傾向がある。また、近位尿細管での再吸収・分泌の過程は尿細管上皮細胞のトランスポーターを介した能動輸送であるため、薬剤と尿細管のトランスポーターの親和性も残留性に影響を及ぼすことになる (図 1-8)。

ネフロンにおける血中薬剤の移行

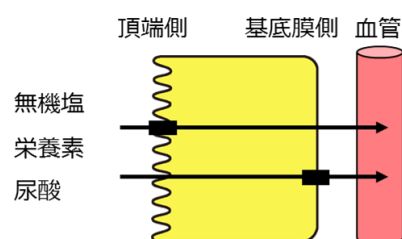


薬剤は糸球体濾過・能動分泌・再吸収の過程の影響を受ける。

図 1-8 血中の薬剤の腎排泄過程

近位尿細管上皮細胞には頂端側と基底膜側に様々なトランスポーターが発現しており、物質の能動輸送を担っている。このうちペプチドを輸送する PEPT 1 や PEPT 2 などのトランスポーターは、近位尿細管の頂端膜に局在して H⁺ とオリゴペプチド類を細胞内に取り込む。この際、このトランスポーターは β ラクタム系抗生物質セファレキシシなど、構造がペプチドに類似した化合物を栄養成分と誤認して再吸収する事が知られている[29] (図 1-9)。

近位尿細管の再吸収



頂端側

- Na⁺チャネル
- PEPT1/2 : 小分子ペプチド
- SGLT1/2 : グルコース
- URT1 : 尿酸

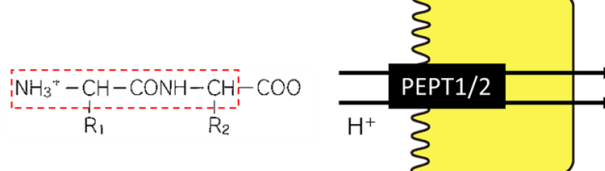
基底膜側

- Na⁺/K⁺ポンプ
- GLUT1/2 : グルコース

- ・様々な輸送体が局在
- ・尿細管から血管への輸送

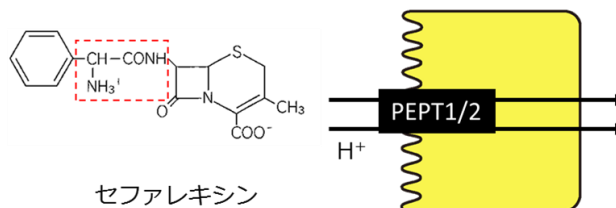
PEPT 1/2によるペプチドの再吸収

小分子ペプチド



H⁺とペプチドを共輸送

βラクタム系抗生物質



セファレキシシ

ペプチド類似化合物を誤認

図 1-9 近位尿細管における薬剤の再吸収

近位尿細管での分泌は血中の毒物などの異物を尿細管上皮細胞のトランスポーターを介して尿細管へ排泄する過程であり、尿細管細胞の基底膜、頂端膜に局在する様々なトランスポーターが関与している。基底膜側には正に帯電した薬剤を認識する有機アニオントランスポーターOAT1/3、負に帯電した薬剤を認識する有機カチオントランスポーターOCT2などが存在しており、頂端膜側には疎水的な薬剤を排泄するP糖タンパク質(P-gp)、多剤排泄輸送体MATE1などが代表的なトランスポーターとして挙げられる。特に、腎分泌の過程を受ける薬剤はMDR1(Multiple drug resistance 1)遺伝子からコードされるP-gpによる輸送に大きく関与している事が知られている[30](図1-10)。例えば、P-gpの基質であるジゴキシンは、P-gpキニジンと併用すると腎分泌が阻害され、血中濃度が上昇する事など、薬剤の併用による腎クリアランスの影響が臨床の現場で問題視されている[31,32](図1-11)。

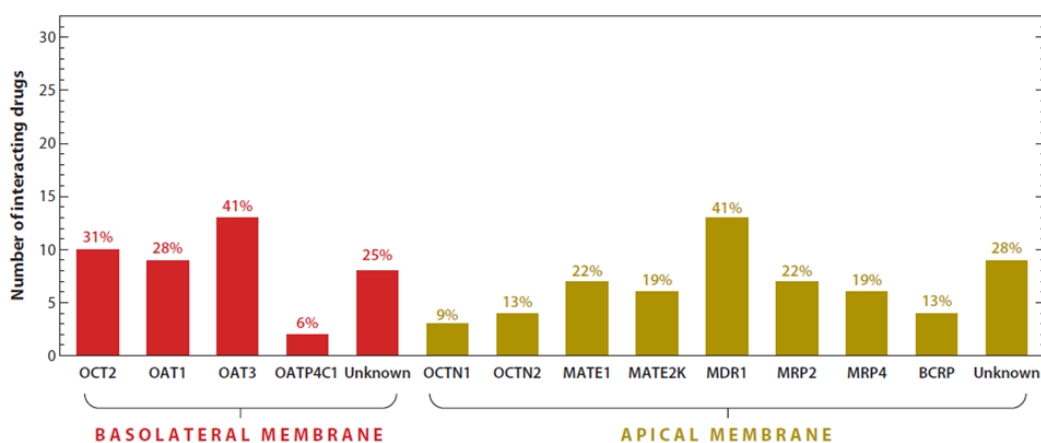
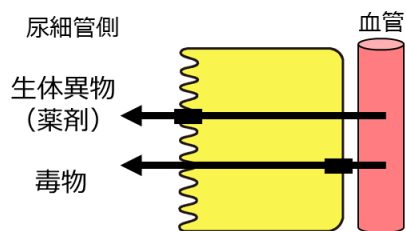


図 1-10 腎分泌に関与するトランスポーター群[30]

近位尿細管の分泌



頂端側

- P-gp : 疎水性化合物
- MATE : 有機カチオン (負に帯電)

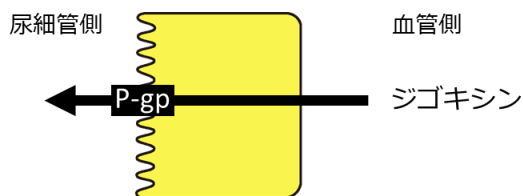
基底膜側

- OCT2 : 有機カチオン
- OAT1/3 : 有機アニオン (正に帯電)

- ・様々なトランスポーターが局在
- ・血管から尿細管への能動輸送

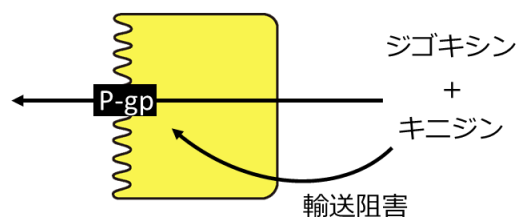
薬剤相互作用による分泌阻害

- ・分泌を受ける薬剤の腎排泄



尿細管で能動的に排泄⇒速やかに体外へ排泄

- ・分泌を阻害する薬剤との併用



併用薬剤による輸送阻害⇒血中濃度の上昇

図 1-11 近位尿細管における薬剤の腎分泌

このように、糸球体での限外濾過、尿細管での再吸収・分泌の過程は薬剤の残留性を理解する上で重要な過程であるため、様々な方法で試験される。

C) 腎排泄の試験法

糸球体の限外濾過や薬剤の血漿タンパク質結合率は、*in vitro* では平衡透析法や限外濾過法を用いて評価が行われている。一例として平衡透析法の概略を示す。平衡透析法は、タンパク質を透過させない透析膜を隔てて、片側のチャンバーにタンパク質の溶液を、他方に緩衝液を満たし、薬剤をチャンバーに添加して十分な時間が経過して平衡状態にさせる方法で、平衡状態に達した時の各チャンバー内の薬剤濃度から、タンパク質結合率を見積もることができる[3]。

一方、分泌や再吸収の能動輸送を受ける基質あるいはその阻害剤として働くかを確認するための試験としては、トランスウェルを用いた輸送実験や腎切片を用いた試験が行われている。トランスウェルを用いた試験では、遺伝子改変されたマウス腎尿細管上皮由来細胞株 S2 細胞、イヌ腎臓尿細管上皮由来細胞株 MDCK 細胞やヒト結腸由来細胞株 Caco-2 細胞などのモデル細胞を膜上に培養し、トランスウェルの Apical 側に薬剤を添加して輸送試験を行う[30]。輸送実験では、濃度と速度の逆数プロットからミカエリス・メンテン式に基づく速度論的な解析の結果、親和性定数 K_m によって基質としての評価が行われ、50%阻害濃度 IC_{50} や酵素と阻害剤の親和性 K_i から基質の阻害が評価される。腎切片を用いた方法も、組織への取り込みを観察することで、基質や阻害の評価が行われている。

In vitro では薬剤の血漿タンパク質結合率や、トランスポーターに関わるパラメータが算出されるのに対して、*In vivo* では薬剤を投与した実験動物の採尿や採血を行い、得られた尿中排泄速度と血中濃度によって腎臓での排泄速度を算出し、ヒト体内での薬物動態の予測が行われている[3]。

1-4 マイクロチップを用いた腎臓モデルの開発

マイクロチップ上で腎臓の機能を再現するための最初の研究は、2001年に Essig らによる C57B/6 マウスから摘出した近位尿細管とブタ近位尿細管上皮由来細胞株 LLC-PK1 細胞のせん断応力下での培養である[31]。この研究ではスライドガラスを貼り合わせて形成した流路高 0.5 mm、流路幅 20 mm、流路長 70 mm の平行プレートチャンバー内に 1~5 mL/min の流れを加え、近位尿細管内の流れを模倣し、流れが与える尿細管上皮細胞の分化の影響について検討した。その結果、せん断応力下での培養によって尿細管細胞のアクチンフィラメントが増加する事などが確認されている。

2007年に Baoudin らは PDMS マイクロチップ内に MDCK 細胞を還流条件下で培養した[32]。この研究では高さ 100 μm の流路内の細胞を、流れを加えながら培養しており、静置培養と比較して MDCK 細胞の増殖速度が上がる事や、塩化アンモニウムの添加による慢性腎毒性試験によって MDCK 細胞の増殖速度が下がるなどが示唆されている。

2010年、Jang らは多孔質膜で仕切られた上下流路を持つ PDMS デバイス内にラット腎臓内部髄質集合管 IMCD 細胞を培養する研究を行った (図 1-12) [33]。膜上の流路に培地を流し、膜下の流路の培地は静置させる事で、尿細管細胞の頂端側にかかるせん断応力と基底側に接する間質の微小環境を模倣している。このデバイス内の培養で、頂端側へのせん断応力によってモデル細胞のアクアポリン 2 などのトランスポーターが極性を持って発現する事や、細胞の高さが増加する事などが確認された。また、尿細管の損傷による腎毒性評価のために、過酸化水素による酸化ストレスの影響なども確認された。

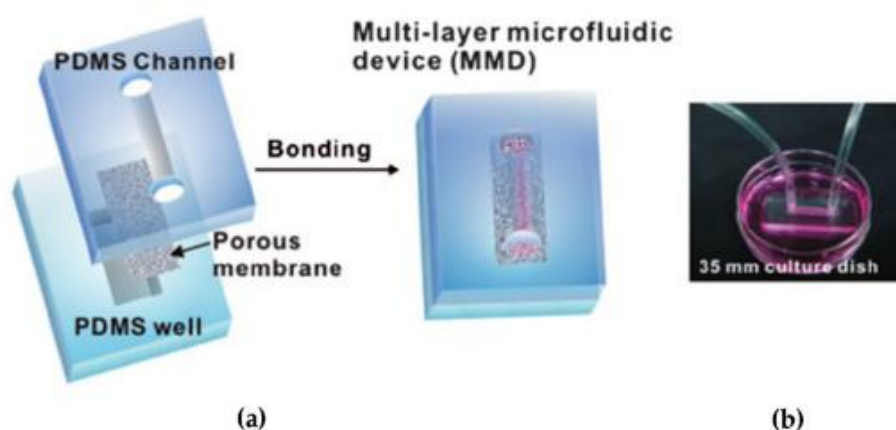


図 1-12 多孔質膜上で細胞を培養するデバイス[33]

2013年にJangらのデバイスはIngberのグループによって改良が加えられ、尿細管のモデル細胞としてヒト初代尿細管細胞HPTECsを用いて培養が行われた[34]。膜上のHPTECsを0.02 Paのせん断応力で3日間培養すると、静置条件と比較して、繊毛構造の形成やアルブミンの取り込み、グルコースの再吸収の増加などが確認された。さらに、急性腎不全を引き起こす抗がん剤シスプラチンの毒性応答も確認された。

尿細管の構造を模倣する研究としては、Cheeらのデバイスが挙げられる[35]。このデバイスは中空状のファイバーがマイクロチップの流路内に接続され、ファイバーの内側にHPTECを培養することで尿細管の管状構造を模倣しており、デバイス内の7日間の還流培養によって、トランスポーターの発現や尿細管の再吸収に関与する能動輸送が確認されている。その他、尿細管のモデルとしては、流れのストレスによるアルブミン輸送の評価[36]、遺伝子解析[37]などの研究も行われている。

腎臓の機能を再現するためのマイクロチップを用いた研究としては、埋込み型の人工腎臓に向けた研究や[38,39]、Weiらの腎臓結石に関する研究[40]、Borensteinらの液/液導波路を用いたネフロン機能を再現するための流路設計など[41]、様々な研究が行われているが、全体としては尿細管の腎疾患に向けた研究が多い。表1-3にマイクロチップを用いた腎臓の研究をまとめたものを示す。

表 1-3 マイクロチップを用いた腎臓モデル

目的	内容	文献
尿細管モデル	流れによる尿細管細胞の分化・増殖の促進	[31],[32]
	細胞極性の模倣、酸化ストレスの評価	[33]
	腎毒性のアッセイ	[34],
	中空のファイバーを用いた尿細管の構造の模倣	[35]
	アルブミンの輸送の評価	[37]
	チップ内で培養した尿細管細胞株の遺伝子解析	[38]
埋込み型の人工腎臓	マイクロ流路を用いた多層透析	[49]
	デバイス内での尿素の膜透過の分析	[40]
腎臓チップ設計のための流体シミュレーション	光導波路を用いたネフロンチップのシミュレーション	[41]
腎結石のアッセイ	チップ内での腎結石の形成の模倣	[42]

1-5 本研究の目的

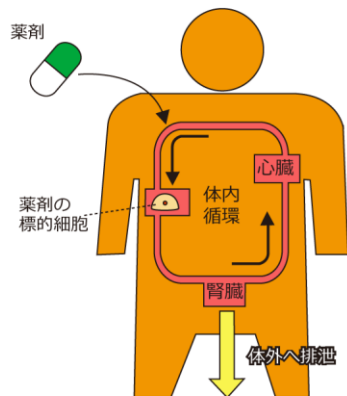
ここまで述べてきたように、薬剤は糸球体における限外濾過、尿細管における再吸収・分泌を受けるため、様々な試験法によって試験されており、新薬開発を効率的に行うために、より人体に近い高度なバイオアッセイ法の開発が期待されている。しかし、マイクロチップを用いた腎臓モデルの開発は腎疾患に向けられた研究が多く、薬剤の腎排泄を模倣して物質を排泄できるマイクロチップの研究は少ない。

Imura らは、体内の循環器系における糸球体での排泄を模倣したマイクロ糸球体モデルを開発した[43]。このモデルは溶液が循環する流路内に透析膜を用いて糸球体の濾過機能を模倣した部位（透析部）を設けたものである。流路内に薬剤の標的細胞を培養する事で、薬剤が腎臓から排泄される過程を模倣しながら薬剤の活性試験を行うことができる。Imura らはこのモデル内で血漿タンパク質結合率の異なる2種類の抗がん剤を用いた抗がん剤試験を行い、薬剤の生体内における性質と一致した結果を得た。しかし、このモデルの問題点としては糸球体モデルの概念実証に留まっており、アッセイの再現性が低い事や、腎臓の機能として重要な尿細管の分泌や再吸収の過程を模倣できていない事が挙げられる。

そこで、本研究ではまず、このマイクロ糸球体モデルをより実用的なモデルに改良し、より再現性が高く、効率的なアッセイの実現を目指した。さらに、尿細管の分泌過程に着目し、このモデル内に尿細管分泌の機能を加えたマイクロ腎モデルを開発して概念実証を試みることとした（図 1-13）。

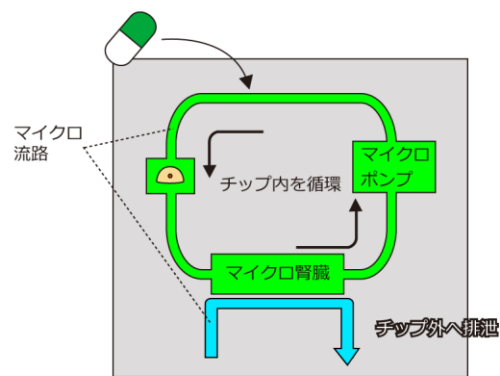
このようなモデルが実現できれば、従来動物実験や臨床試験で行われていた薬剤の血中濃度の消失速度を *in vitro* で行える事や、Human-on-a-chip における排泄部位の開発に貢献できると考えられる。

体内での腎排泄過程

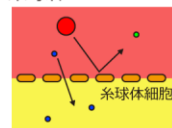


マイクロ循環器モデル

チップに
集積化

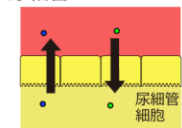


糸球体



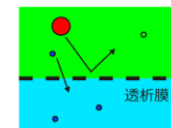
低分子化合物の
限外ろ過

尿細管



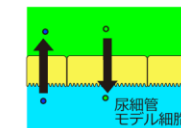
再吸収・分泌

透析部



透析膜による
サイズ分離

再吸収部・分泌部



細胞による
能動輸送

図 1-13 本研究の目的

2章 実験材料および手順

2-1 マイクロチップの基板材料

現在、マイクロチップの素材には主にシリコンやガラス、各種プラスチックなどが用いられている。その中でもガラスは透明性と耐薬品性に優れているため、古くから利用されてきた。また、プラスチックは丈夫で製造再現性が高く、さらには低価格であるため近年多くの研究で使用されている。

培養細胞を使用したバイオアッセイに用いるマイクロチップ基板には、化学的に不活性なことに加えて、細胞に対して毒性を持たないことが必要である。また、光学的な観察を利用することを考慮すると、観察に用いる波長域に吸収や蛍光を持たないことが要求される。さらに、本研究では基板を積層し、層と層の間に膜を挟み込む事を想定している。そのため、異物を挟み込むための柔軟性が求められる。これらを満たすマイクロチップの基板材料として、近紫外線領域から可視領域の広い範囲で吸収や自家蛍光を持たず、化学的に不活性なシリコン系樹脂であるポリジメチルシロキサン (PDMS) を用いることとした (図2-1) [44]。

PDMS は細胞実験のためのマイクロチップの素材としてよく用いられており、細胞毒性がないことが知られている[45]。さらに、ゴム状の樹脂のため、弾力性、柔軟性があり、これを利用して膜など薄い異物の導入および固定が可能となる。また、PDMS は熱硬化性樹脂であり、PDMS シートの造形は鋳型からの成型によって行うこととなる。同じ鋳型から作製した PDMS マイクロチップは高精度で同型となる。したがって、複数のチップを用いて並列的にバイオアッセイを行った際に、誤差の小さい比較が可能となるため、PDMS はマイクロチップの基材として優れた特徴を持つと考えた。

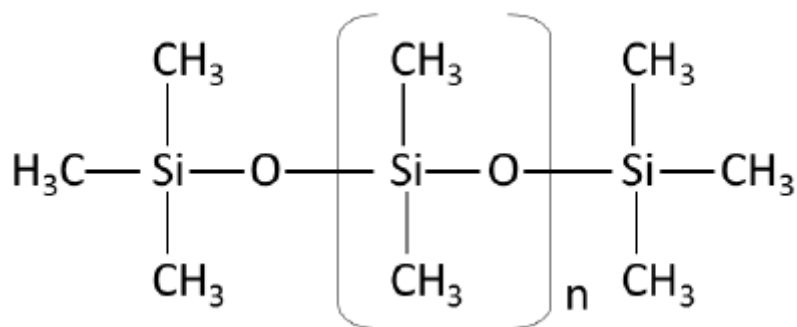


図 2-1 PDMS の構造

2-2 鋳型の作製

A) フトリソグラフィーによる鋳型の作製

複雑な構造の鋳型は、半導体製造において利用されているフトリソグラフィーにより作製した。フトリソグラフィーとは、基板上にフォトレジストと呼ばれる光硬化性樹脂を塗布し、設計した流路パターンが透明になっているフィルム（フォトマスク）を被せ、その上から紫外線照射によりフォトマスクのパターンを転写して樹脂を硬化させ、現像する事で目的の構造を造形する方法である（図2-2）。

鋳型の作製はすべて暗室で行った。暗室内の照明にはフォトレジストが感光しないように波長 500 nm 以下の光をフィルムによりカットした半導体工場用蛍光灯を用いた。基板には顕微鏡用スライドガラス（松浪硝子）、フォトレジストには SU-8（Micro Chem）、現像液には乳酸エチル（和光純薬工業）を使用した。流路パターンは PC ソフトウェア Adobe Illustrator で行い、印刷業者に外注して製版フィルム上にイメージセッターを用いて 4000 dpi, 175 線で印刷したものをフォトマスクとして使用した。

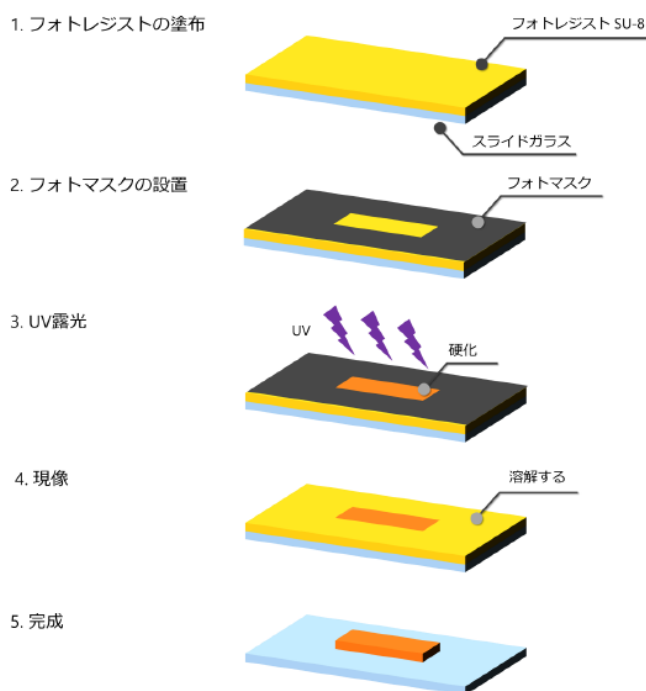


図 2-2 鋳型の作製工程

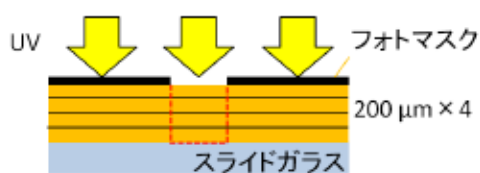
B) 裏面照射法による厚膜鋳型の作製

本研究ではチップ内の細胞培養槽として、通常のマイクロチップに比べて深い500~1000 μm の流路高を持つ流路を構築する必要がある。一般に、スピコートによりフォトレジストを塗布する場合、一回のスピコートでは通常200 μm より厚く製膜することは難しい。通常のリソグラフィ法によって厚みのある鋳型を作製する方法としては、フォトレジストを複数回積層させてフォトマスクの上から紫外線を露光させる方法が一般的に知られている。しかし、この方法ではフォトレジストを積層させる際に全体として長い加熱時間が必要となる。フォトレジストは長時間加熱するとガラス基板から剥離しやすくなるため、一般的なリソグラフィ法で厚膜の鋳型を作製するのは困難であった。

そこで本研究では、専用のケースを作製し、ケースにレジストを流し込んで基板の裏側から露光する事で、レジストを積層させずに高い鋳型を作製する方法を新たに考案した(図2-3)。従来法ではSU-8の製膜時に構造物の高さが決まるが、開発した方法では露光時間を調整することで、硬化させる高さを制御する。露光時間と流路の高さの関係を図2-4に示す。この方法ではフォトレジストの積層を必要とせず、短時間で簡便に高い500~1000 μm 程の鋳型の作製が行う事ができた。そこで、培養槽の作製にはこの方法を用いた。作製した鋳型の写真を図2-5に示す。

従来法

- ①フォトレジストの積層
- ②紫外線照射



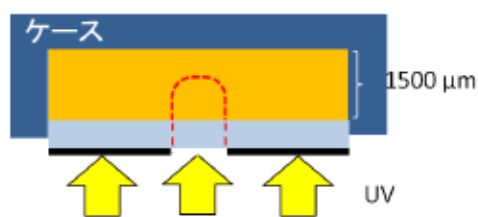
- ②未固化部分の洗浄



😞 レジストの積層に長い時間が必要

裏面照射法

- ①ケースにレジストを流し込む
- ②基板の裏面から照射



- ③未固化部分の洗浄

😄 レジストの積層無し
簡便な高い鋳型の作製

図 2-3 裏面照射法による厚膜の鋳型の作製工程[46]

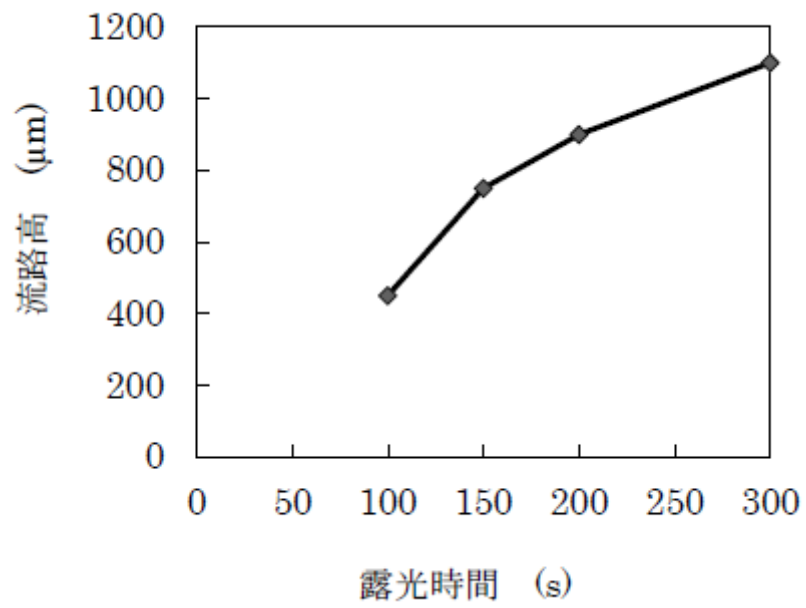


図 2-4 裏面照射法による露光時間と流路高の関係[45]

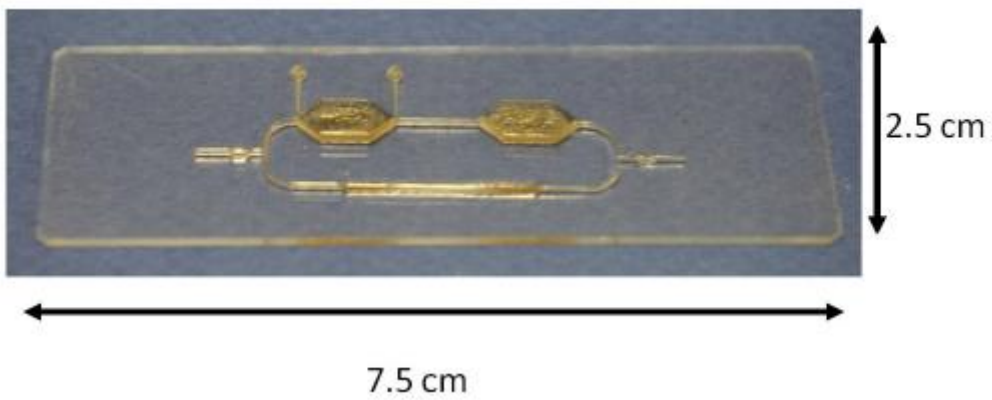


図 2-5 裏面照射法で作製した鋳型[46]

2-3 チップの作製

A) PDMSシートの作製

マイクロチップの流路を作製する工程を図 2-6 に示す。2-2 で作製した鋳型に未重合の PDMS プレポリマーを流し込み、加熱して重合させることで流路形状を持つ PDMS シートを得た。PDMS は SILPOT 184 W/C (ダウコーニング) の主剤と、架橋剤を 10:1 で混合したものを用いた。PDMS シートの厚さの制御は、目的とする厚さを有したアクリル製の枠に PDMS プレポリマーを流し込むことで行った。本研究では 4 mm 厚と 1.5 mm 厚のアクリル製の枠を用いた。乾熱器を用い、90 °C の条件下で PDMS プレポリマーを加熱・硬化させることで PDMS シートを得た。

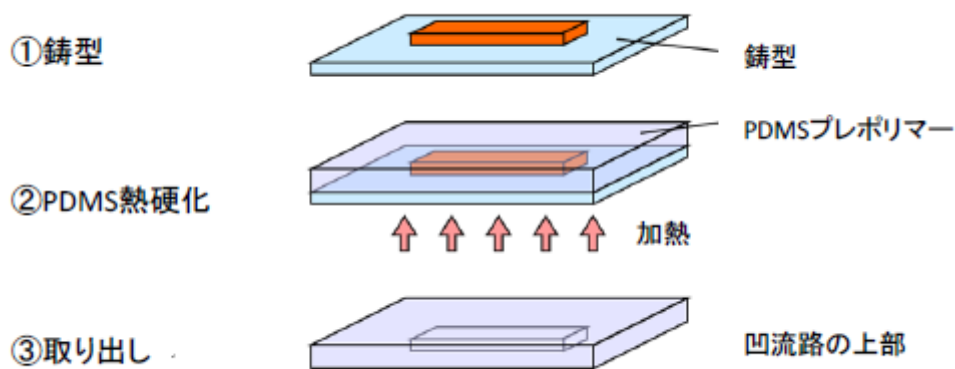


図 2-6 PDMS シートの作製工程

B) 両面に流路を造形したPDMSシートの作製

PDMS シートの表裏両面に流路を造形する方法を図 2-7 に示す。コの字型に加工したアクリル板の両面に鋳型を向かい合わせにし、鋳型と鋳型の間に PDMS プレポリマーを流し込み、加熱硬化することで、両面に流路が造形されている PDMS シートを得た。

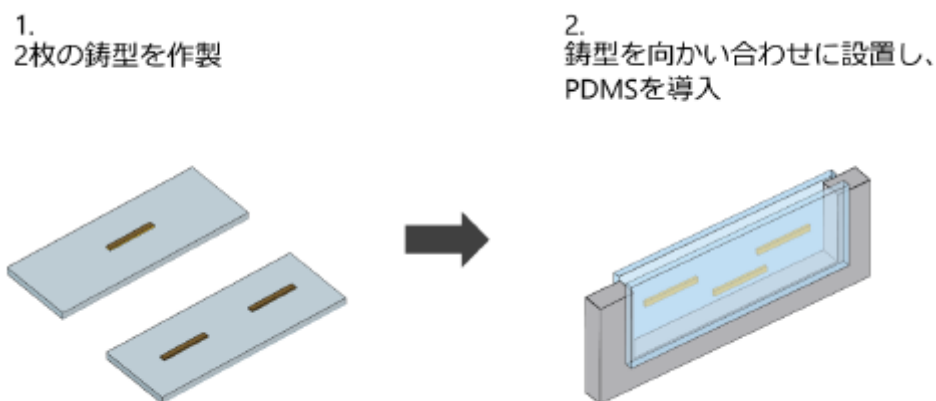


図 2-7 両面に流路を造形した PDMS シートの作製工程

C) PDMS 薄膜の作製

厚さ 1 mm 以下の PDMS の薄膜を作製する方法を図 2-8 に示す。まずアクリル板に PDMS プレポリマーを塗布し、1250 rpm でスピコートすることで、必要な高さまで薄く伸ばした。その後ホットプレートの上で加熱することにより目的の PDMS 薄膜を得た。しかし、この PDMS シートは非常に薄いため、アクリル板から剥がすことが困難であった。そのため、チップ作製時にこの薄膜と貼り合わせる相手となる PDMS シート（厚さ 3 mm）を先に貼り合わせたのち、アクリル板から剥がす方法を考案した。

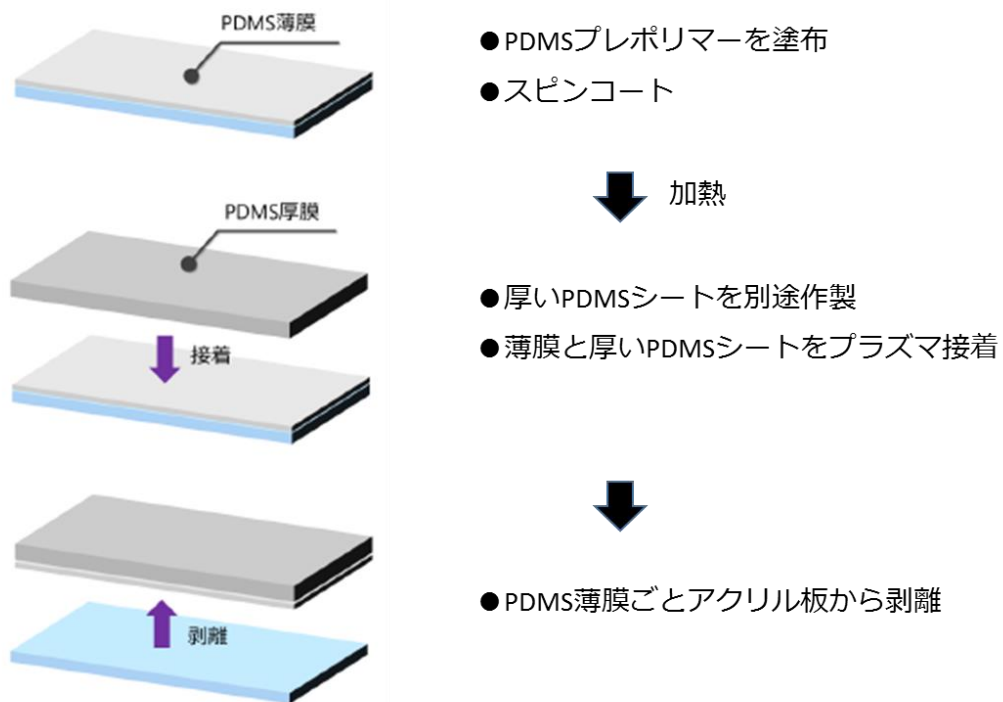


図 2-8 PDMS 薄膜の作製工程

D) PDMSシートの貼り合わせ

作製した PDMS シートは、生検トレパン (KAI medical、BPP-20F) を用いて縦穴を開け、リザーバーを作製した。凹型の流路構造を造形した PDMS シートと別の PDMS シートあるいはガラス基板を貼り合わせることによって流路に蓋をした。PDMS は自身の接着力で PDMS 同士あるいはガラス基板と接着できるという特徴があるが、耐えられる圧力には限界がある。そこで半永久的な接着を行うため、プラズマリアクターPDC200 (ヤマト科学) による酸素プラズマ処理により接着した[47]。酸素プラズマ処理による接着の原理は詳しく解明されていないが[48]、接着面が同化しており剥離が不可能になることなどから共有結合に近い接着が成されているものと考えられる。本研究では、酸素流量 40 mL/min、25 °C、0.1 MPa の条件下で、出力 300 W で 10 s、接着面にプラズマ処理を行い、PDMS シートを貼り合わせた。

2-4 マイクロチップへの送液

図 2-9 にマイクロチップへの送液系の模式図を示す。チップに外部から溶液を流し続けるために、シリンジポンプ KDS230 (Kd Scientific) を用いた。マイクロチップへのチューブの接続はチップ上面に設けられたリザーバー (直径 1.8 mm) に外径 2.0 mm テフロンチューブを挿しこむことで行った。

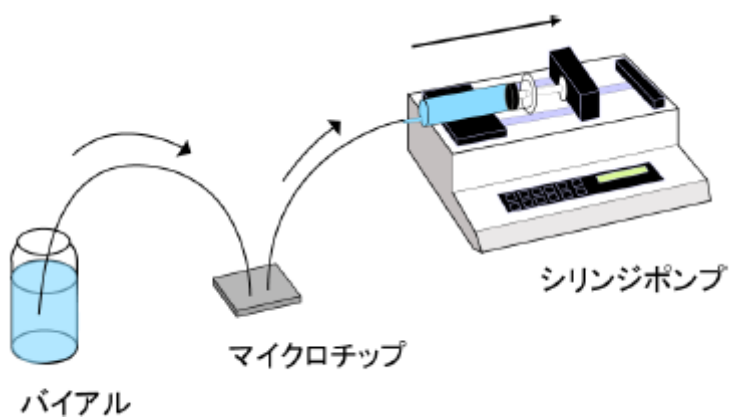


図 2-9 マイクロチップへの送液系模式図

2-5 細胞培養

A) MCF-7細胞

本研究では、モデル薬剤の標的部位の細胞として、ヒトの乳がん由来細胞株MCF-7細胞を選定した。形態的特徴として上皮様の扁平な形をしており（図2-10）、抗がん剤によって死滅する事が知られている[49]。また、生育が良いことも特徴であり、マイクロチップ内で容易に培養することが可能である。本細胞の継代頻度は約3～6日である。

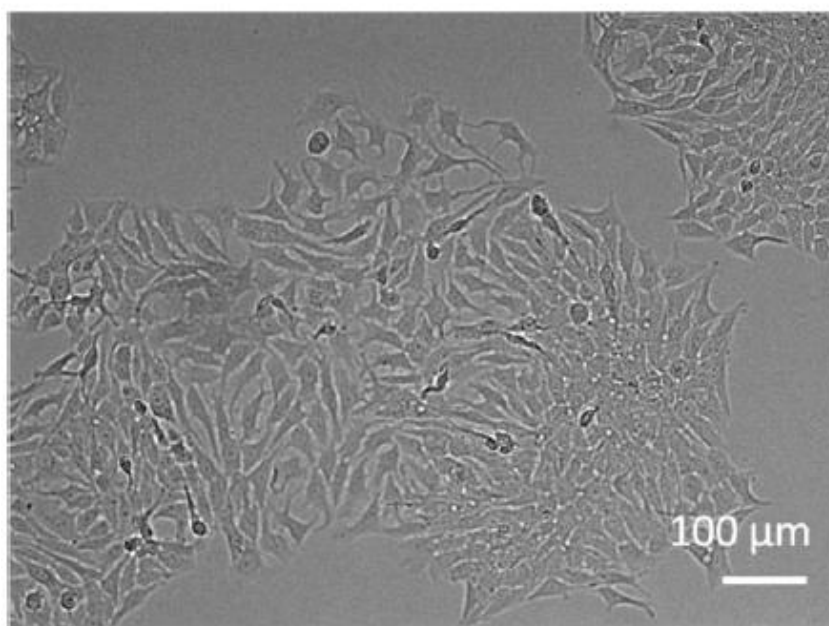


図2-10 MCF-7細胞

B) Caco-2細胞

本研究では、近位尿細管のモデル細胞として、ヒト結腸癌由来細胞株 **Caco-2** 細胞を選定した。形態的特徴として上皮用の扁平な形をしており、多孔質膜上で単層を形成する（図 2-11）。隣接する **Caco-2** 同士がタイトジャンクションを形成して物質の透過を制御する事や、トランスポーターの発現が良好である事から、薬剤の腸管吸収のアッセイに用いられる。また、**P-gp** など近位尿細管と同様のトランスポーターを発現することから薬剤の腎分泌アッセイのモデル細胞としても用いられている [50]。本細胞の継代頻度は約 3~6 日である。

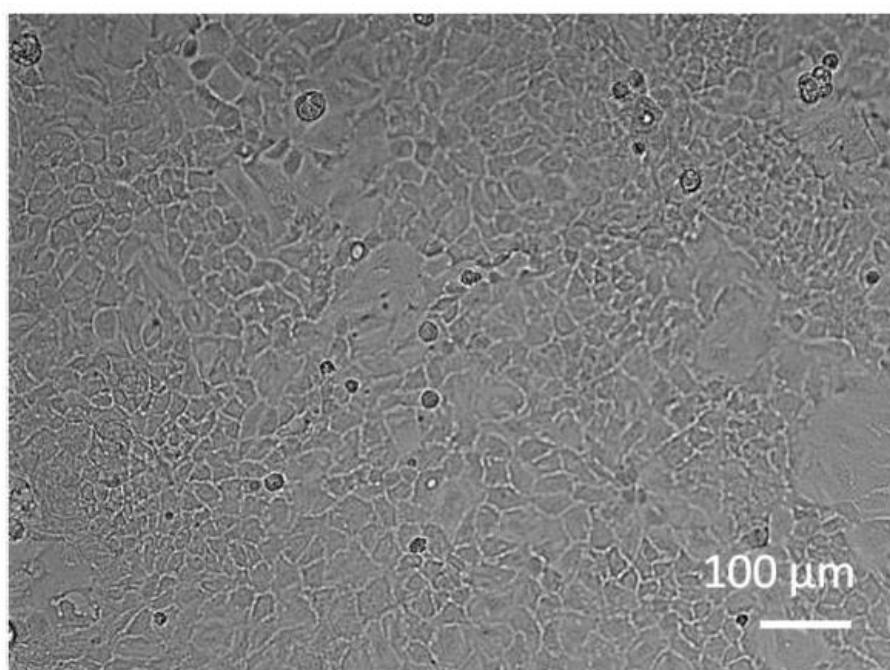


図 2-11 Caco-2 細胞

C) 培地

培地は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco) に Fetal Bovine Serum (FBS; Gibco) を 10%、抗真菌剤 Anti-Anti (Invitrogen)、MEM Non-Essential Amino Acid Solution (NEAA; Gibco) をそれぞれ 100 倍希釈となるように添加したものをを用いた。

D) 細胞培養のためのマイクロチップの前処理

マイクロチップ内部で細胞を培養する際、細胞を乾燥とコンタミネーションから防ぐ必要がある。そのため、マイクロチップの滅菌を行い、無菌的で保湿可能な環境を整えた。マイクロチップは細胞導入前に、クリーンベンチ内の殺菌灯直下に3時間静置し、紫外線による滅菌を行った。また、メンブレンフィルター上での細胞接着をよりよくするため、コラーゲンコーティングを行った。Cellmatrix Type 1-C コラーゲン（新田ゼラチン）を希塩酸で10倍希釈してマイクロチップに導入し、インキュベーター内に1時間静置した。静置後、溶液を流路から回収し、クリーンベンチ内の殺菌灯直下に1時間静置することで乾燥させた。

E) 細胞懸濁液の調製

細胞は60 mm デッシュで70%コンフルエントまで培養した後、0.05%トリプシン EDTA 溶液（Invitrogen）を用いてデッシュ上の培養細胞を剥離させ、その懸濁液を2mLのマイクロチューブ内に移した。これを6800 rpm、1 minの条件で遠心し、マイクロチューブ底部に沈降した細胞ペレットに対して2 mLの培地を添加し、ピペッティングを行うことで細胞懸濁液を調製した。

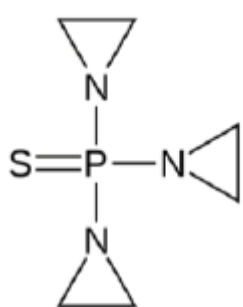
F) マイクロチップでの細胞培養

0.05%トリプシン-EDTA 溶液を用い、デッシュ上の培養細胞を剥離させ、適切な濃度になるよう培地に懸濁させることで細胞懸濁液を調製した。その後、D)で前処理を施したチップの細胞培養部に細胞懸濁液を導入し、CO₂インキュベーター内で37 °C、5% CO₂、湿度100%の条件下、培養した。

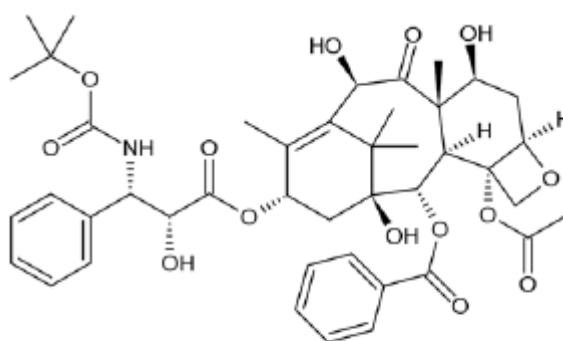
2-6 抗がん剤のアッセイ

A) 抗がん剤

試料として血漿タンパク質結合率の異なる2種類の抗がん剤を用いた（図2-12）。血漿タンパク質非結合性の抗がん剤としてチオテパを、結合性の抗がん剤としてドセタキセルをそれぞれ培地に添加した。チオテパは血漿タンパク質結合率が10%程度の薬剤であり腎臓から排泄されやすい[52]。一方、ドセタキセルは血漿タンパク質結合率が90%以上であり腎臓から排泄されにくい事が知られている[53]。



チオテパ



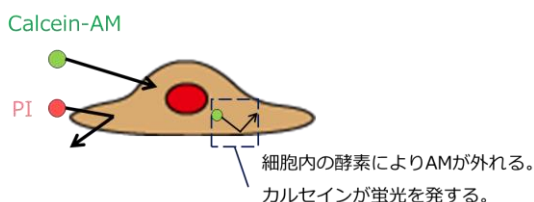
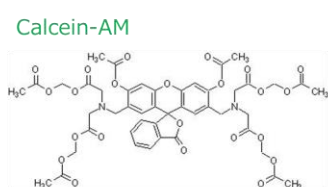
ドセタキセル

図 2-12 抗がん剤の構造式

B) 抗がん剤の活性評価

本研究では、細胞をLive/Dead染色による生死判定を行うことで、抗がん剤の活性評価を行った。生細胞の染色にはCalcein AM (同仁化学) を、死細胞の染色にはPropidium Iodide (PI; Sigma) を用いた。Calcein AMは細胞内に取り込まれると、細胞内エステラーゼによりAM基が切断されて蛍光を発する性質を持ち、生細胞のみが緑色に蛍光する[53]。PIは、細胞膜を失った細胞の核に入り、赤色の蛍光を発することにより、死細胞の核を染色する[54]。(図2-13) PBS 2 mLに4 mM Calcein AMを2 μ L、2 mM PIを2 μ L添加したものを培地と置換し、30分インキュベートすることで染色を行った(図2-14)。

生細胞



死細胞

PI (Propidium Iodide)

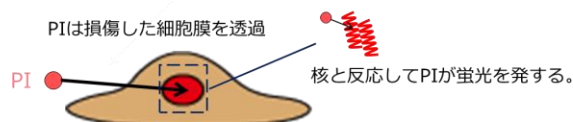
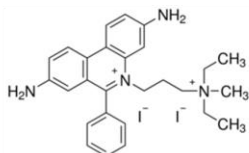


図 2-13 Live/Dead の染色原理

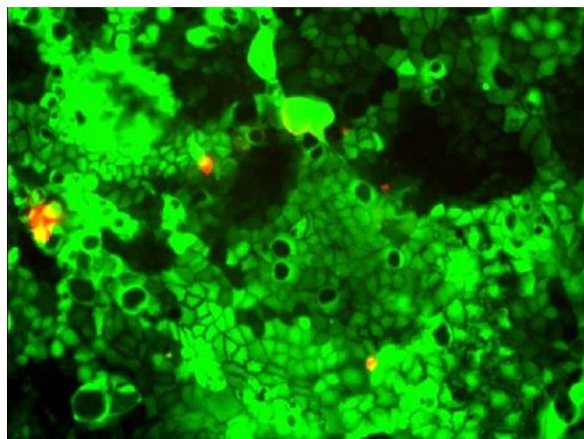


図 2-14 細胞の Live/Dead 蛍光写真

2-7 測定装置

細胞の生育状態の観察や、各種バイオアッセイのための評価手段として、本研究では培養細胞の位相差像の観察および蛍光染色による蛍光イメージングを行う必要がある。また、開発するマイクロチップ上面には、送液のためのチューブが多数林立し、上側からの観察が妨げられるため、チップ底面からの観察が好ましい。そこで本研究では、倒立型位相差付き蛍光顕微鏡 IX71 (オリンパス) を、画像取得には冷却 CCD カメラ Rolera-XR (Q imaging) を用いた (図 2-15)。

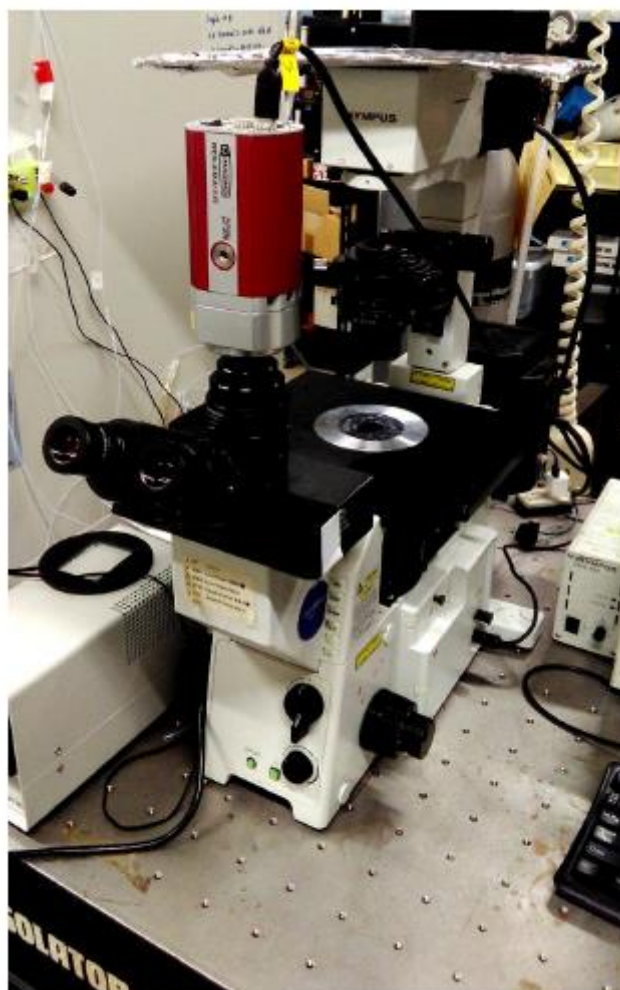
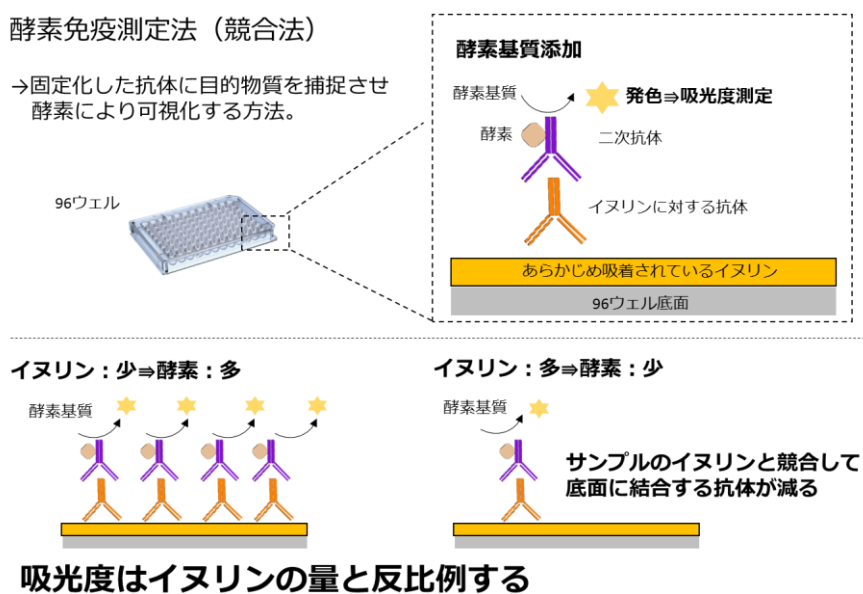


図 2-15 倒立型位相差付き蛍光顕微鏡 IX71

2-8 イヌリンの定量

イヌリンの定量には FIT-GFR イヌリンテストキット (BioPal) を用いた。これはウェル底面に予め吸着しているイヌリンと試料中のイヌリンを抗体と競合的に反応させる事によって、イヌリンの定量を行う競合 ELISA による分析キットである (図 2-16)。二次抗体は酵素基質と反応し、450 nm の吸光度を測定することで、イヌリンの定量を行う事ができる。吸光度の測定にはプレートリーダーの 2390 EnsPire Alpha を用いた。



- ①イヌリン (0.05, 0.1, 0.5, 1 μg/mL)
- ②ウサギ anti-イヌリン抗体 (洗浄・60 min)
- ③ヤギ anti-ウサギIgG-HRP (洗浄・30 min)
- ④HRP基質 (30 min)
- ⑤反応停止液 ⇒ プレートリーダーで測定

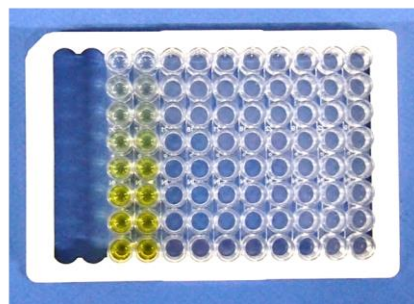
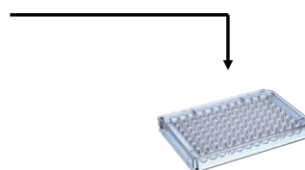


図 2-16 イヌリンの定量方法

2-9 消失速度定数の算出

静脈投与された薬剤は血中から指数的に減少し、その速度は反応速度の一次式に従う。この時、薬剤の血中濃度 C [mg/L] は次式で表される。

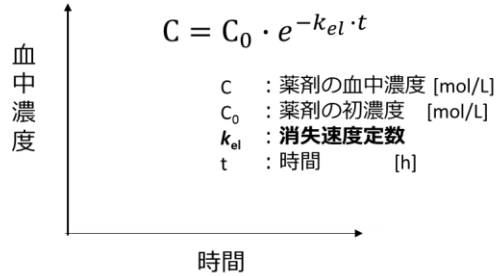
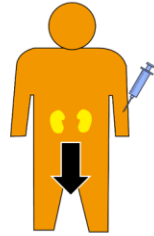
$$C = C_0 \cdot e^{-k_{el} \cdot t} \quad \dots (1)$$

ここで、 C_0 は薬剤の初濃度 [mg/L]、 k_{el} は消失速度定数、 t は時間[s]を表す。消失速度定数 k_{el} はその薬剤の排泄速度の程度を表し、薬剤の消失速度を考える上で非常に重要なパラメータとなっている。この定数を算出するためには、(1)式の両辺を対数に変換した式が用いられる。

$$\ln C = -k_{el} \cdot t + \ln C_0 \quad \dots (2)$$

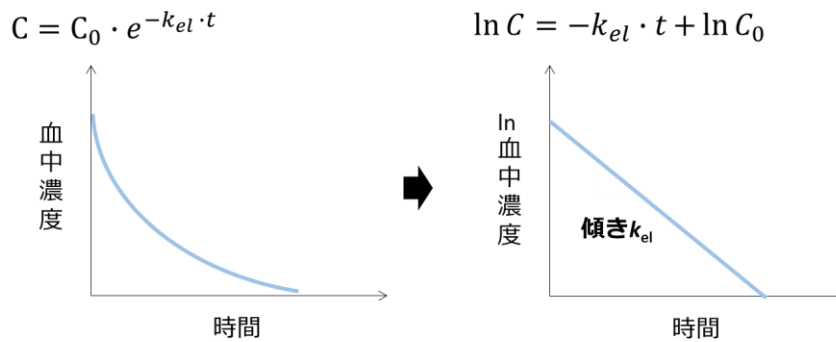
ここで、縦軸を $\ln C$ 、横軸を時間 t でプロットすると、血中濃度の対数は消失速度定数 k_{el} を傾きとした一次式で求められる事から、 k_{el} を実験的に算出することができる (図 2-17)。算出された k_{el} は、次式で示すように薬剤の生物学的半減期 $t_{1/2}$ やクリアランスと関係しているため、薬剤の排泄速度や投与時の血中濃度の推測などに用いられる[3]。

静脈投与した薬の血中濃度



薬剤の血中濃度は指数的に減少する。

消失速度定数 k_{el} : 薬剤の消失の程度を表すパラメータ



自然対数を取って傾きを求めることで算出できる。

図 2-17 消失速度定数算出の概略

2-11 透過係数の算出

見かけの透過係数 P_{app} は次のように算出した。

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \cdot \frac{1}{C_0 A}$$

ここで、 Q は輸送された物質量[mol]、 t は時間[h]、 C_0 は初濃度[mol/L]、 A は膜面積[cm²]を表す。この式より、細胞による物質輸送の評価を行った。

第3章 集積化マイクロ糸球体モデルの開発

3-1 序論

1-5 に記した通り、Imura らはバイオアッセイのためのマイクロ糸球体モデルを開発した[43]。これは、体内を循環している薬剤が腎臓の糸球体から排泄される過程を模倣したマイクロチップであり、薬剤を含む溶液をマイクロポンプによって循環させる循環流路と、外部からの透析液が流れる透析流路が透析膜を介して接する構造をしている。図 3-1 このモデルの模式図を示す。Imura らはこのモデルを用いて循環流路内にがん細胞を培養し、抗がん剤を循環させて抗がん剤を実現したが、マイクロポンプの流速が制御できない事、実験操作が煩雑、アッセイの誤差が非常に大きい事などが従来のマイクロ糸球体モデルの課題として挙げられている[55]。そこで、本研究ではこれらの問題を解決し、より実用的でハイスループットなアッセイを実現するモデルの開発を目指した。

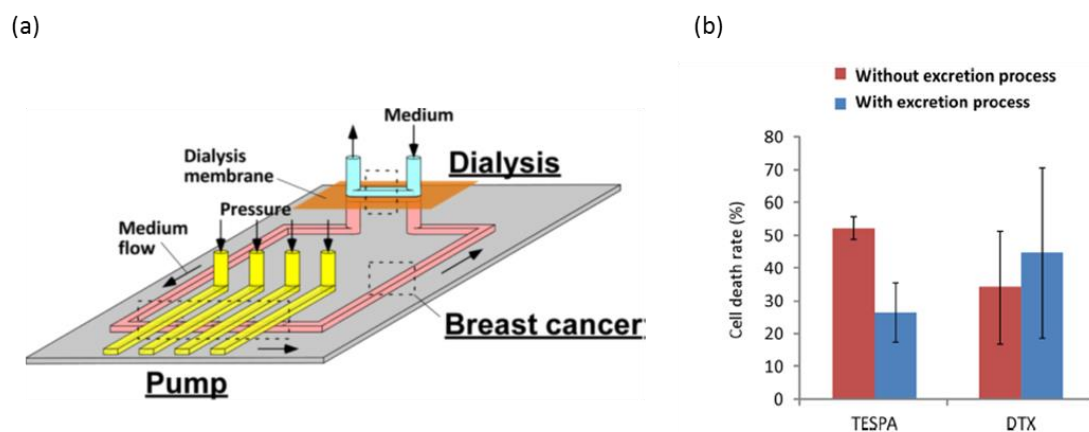


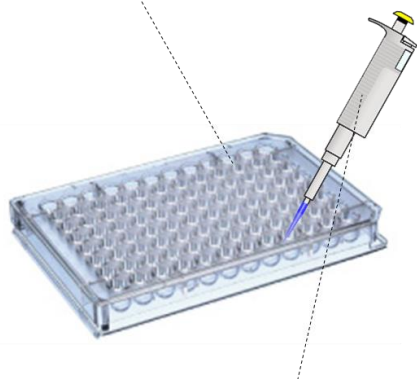
図 3-1 従来のマイクロ糸球体モデル(a)と抗がん剤アッセイの結果(b)[42]

3-2 集積化系球体モデルの設計

従来のモデルでのアッセイの問題点として、ウェルなどを用いた通常の抗がん剤試験に比べてアッセイの誤差が非常に大きい事が挙げられる。この原因としては、ウェルとマイクロモデルの実験系の違いが大きく関与していると考えられる。96 ウェルなどを用いた細胞実験では、ウェル間の環境の差はほとんど無く、細胞の状態や反応時間などを揃えて並列実験しやすい。それに対して、マイクロモデルでは、チップ間で形状の誤差が生じる。また、チップ外から液体やガスを送るためのチューブを複雑に接続した状態のチップをインキュベータに出し入れして実験を行うため、並列実験が困難である（図 3-2）。

ウェルなどの細胞実験

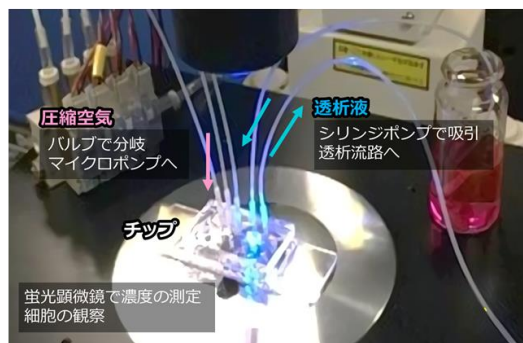
ウェル間の誤差がない



細胞の状態を揃えた並列実験が容易

マイクロモデル

チップの作製工程が困難 ⇒ 作製チップ間の誤差



外部装置との複雑な接続 ⇒ 並列した実験が困難

図 3-2 ウェルとマイクロモデルのアッセイ操作の比較

このため、マイクロ糸球体モデルでのアッセイの再現性を向上させるためには、チップ間の形状誤差を小さくする設計や、並列実験を容易に行う実験系の改善などが必要であると考えられる。そこで、マイクロ糸球体モデルの設計を見直し、1つのマイクロポンプで複数のユニットの循環流路を並列駆動させる集積化マイクロ糸球体モデルの開発を目指した。このようなモデルの開発が実現できれば、1回の作製工程で3つのユニット作製が行なえ、チップ間の誤差が小さくなるだけでなく、このようなマイクロモデルでは従来実現できなかった複数アッセイの並列実験が実現できると考えられる。

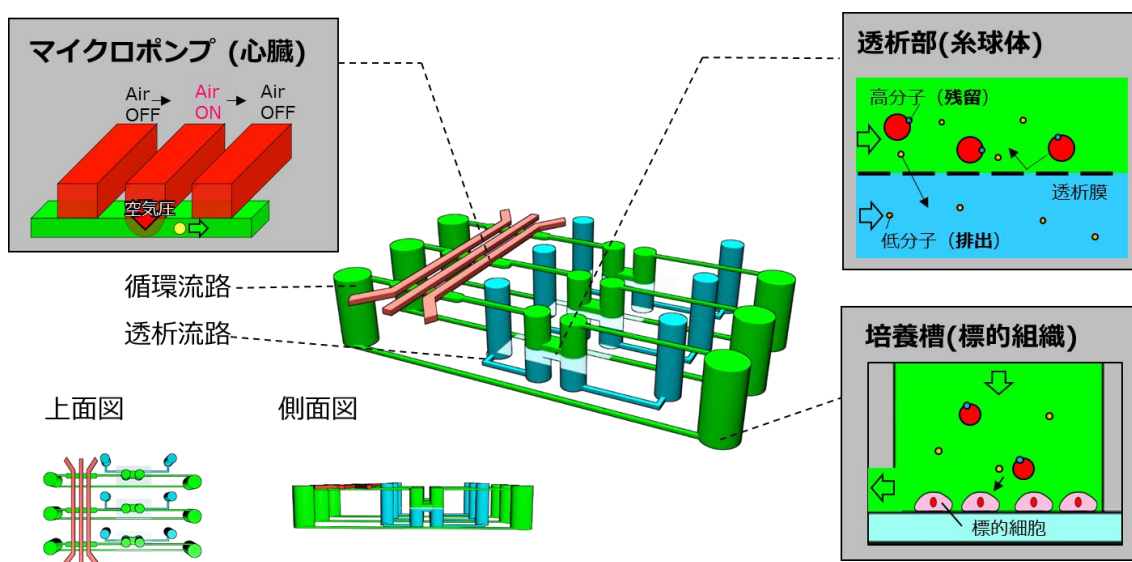


図 3-3 集積化マイクロ糸球体モデルの模式図

集積化マイクロ糸球体モデルの模式図を図 3-3 に示す。糸球体モデルの1ユニットは、循環流路及び透析流路から構成されており、2つの流路は透析膜を介して接している。このため、高分子は透析膜を通過できず循環流路に残留し、低分子のみが透析流路へと排泄される。薬剤の標的細胞を循環流路の底面に培養し、薬剤の応答を死細胞率によって評価する。アッセイを並列的に行えるようにするため、1つのマイクロポンプで3つのユニットの循環流路を並列駆動させる構造に設計した。これにより、マイクロポンプによる流速制御や並列した溶液の循環、3連での透析実験とアッセイの効率化、それによる再現性の向上を目指した。

3-3 集積化モデル作製のための基礎検討

A) 液漏れ防止流路の設計

集積化モデルの設計にあたり、複数の透析部を一枚のチップに集積させた影響を確かめた。設計の基礎検討を行うため図 3-4 で示すような複数の透析部を持つチップを試作し、フルオレセインを用いて透析部の流路に漏れが無いかを確かめた。その結果、多くのチップで膜と膜の間に液漏れが生じた。この原因としては、透析膜と PDMS の素材の相性が関係しており、親水的な再生セルロース製の透析膜はチップの素材である疎水性の PDMS 接着しないため、ユニット間の距離が近いと PDMS と透析膜の隙間から他ユニットへの液漏れが生じる事が考えられる。単純に流路を隣接するだけでは、目的とする設計のチップを用いて透析などを行うことが困難であったため、液漏れを防ぐ方法を検討した。

透析部を集積化した試作チップ

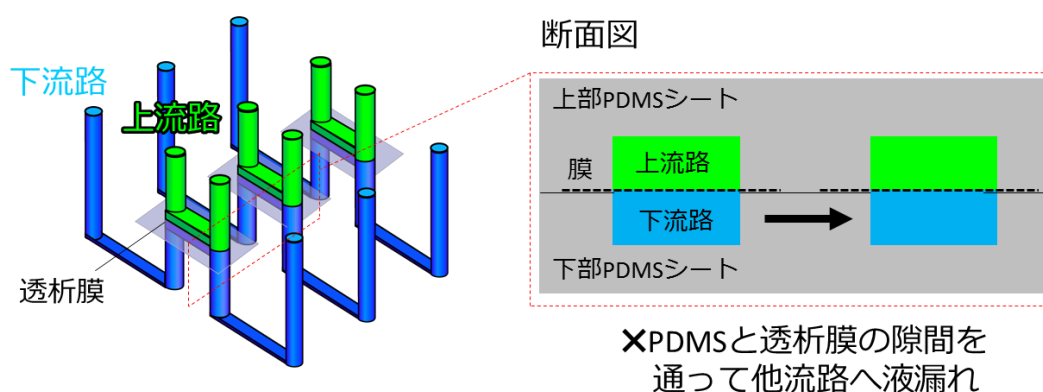


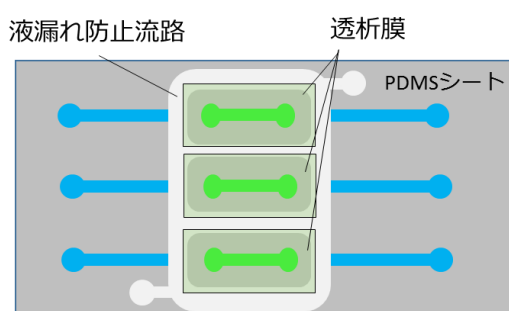
図 3-4 集積化モデルでの流路間での液漏れ

一般に、膜と PDMS とを接着させる方法としては PDMS プレポリマーをトルエンで希釈した溶液 (PDMS モルタル) を接着剤として用いる方法が利用されている[56]。しかし、この方法は主にポリエステル製のメンブレンフィルターと PDMS の接着に用いられており、親水的であり、水に濡れると体積が変化する再生セルロース製の透析膜に用いるとモルタルの接着力が膜の体積変化に耐えられずに接着状態を保つことが出来なかった。

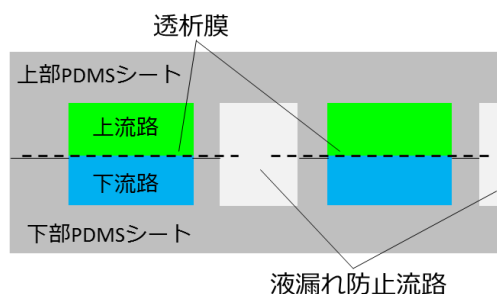
そのため、透析膜の接着方法として次のような方法を考案した。まず初めに透析膜の端を浮いた状態にするための空洞の流路 (液漏れ防止流路) を構築し、この流路に PDMS プレポリマーを導入した。その後チップ全体を加熱することによって流路内の PDMS を重合させて膜を接着させた (図 3-5)。液漏れ防止流路では、複雑な形状の流路に粘性が高い PDMS プレポリマーを透析部へ侵入させずに導入する必要があるため、800~900 μm の高さのある流路を作製する必要がある。そこで、液漏れ防止流路を作製する方法を検討した。

1. 液漏れ防止流路を構築

上面図

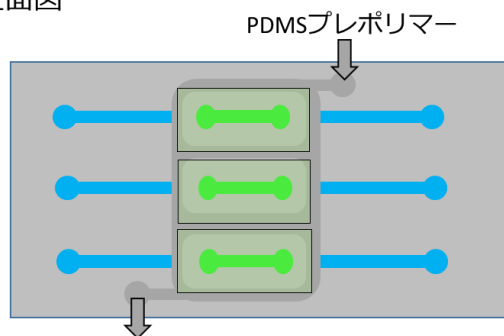


断面図



2. PDMSプレポリマーの流し込み、加熱

上面図



断面図

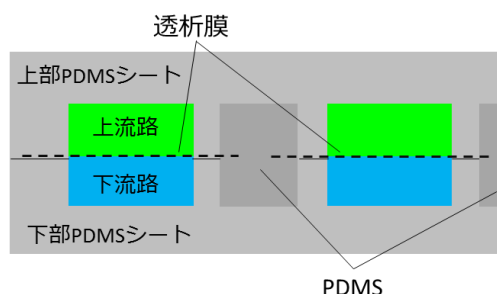


図 3-5 考案した液漏れ防止流路による透析膜と PDMS との接着

B) 液漏れ防止流路のための鋳型の作製

フォトリソグラフィ法でこのような高さの鋳型を作製する方法としては、フォトレジストを積層させる方法や、裏面照射法が考えられるが(2-2)、積層させる方法では一回の積層に20~30 minの加熱が必要であり、目的とする高さのレジストを積層させるのに必要な時間が4~5時間と長くなる。また、裏面照射法では流路の断面形状が半円形になってしまい、膜を支える柱構造を造形することが困難であった。

そこで、レジストを積層せず、基板上に重量を測定しながらレジストを塗布することにより、レジストの重さで鋳型の高さを制御する方法を検討した(図3-6)。レジストは常温では粘性が高いために、塗布されたレジストの表面は不均一であるが、加熱して静置させることでレジストの表面を均一にした。フォトレジストSU-82100をスライドガラスに0.5、1.0、2.5、3.8 g塗布し、140°Cで40 min加熱し、フォトマスクを乗せてから紫外線を350 s照射した。未固化のレジストを乳酸エチルで洗浄して作製した鋳型の高さを顕微鏡で測定した。レジストの重量と鋳型の高さの関係を表すグラフを図3-7に示す。

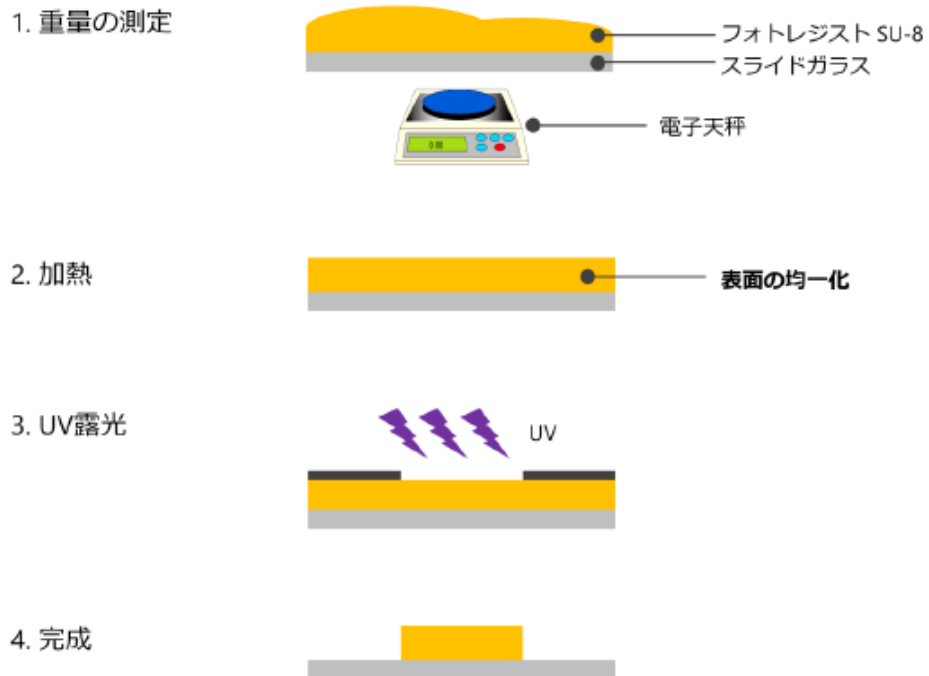


図 3-6 重量制御法による鋳型の作製方法

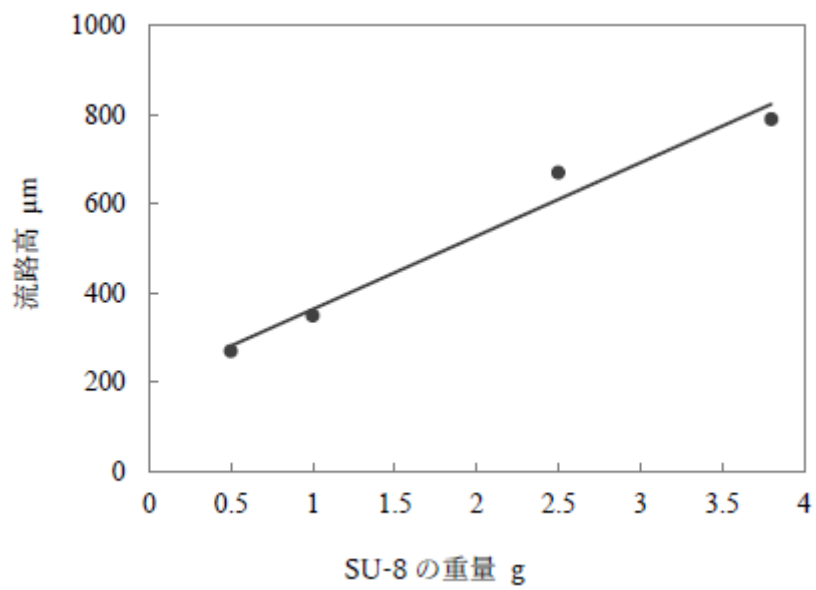


図 3-7 SU-8 の重量と流路高の関係

この重量制御法により、250~800 μm の鋳型を簡便に作製することができた。この方法を用いて目的とする 400~500 μm の流路の作製を試みた。SU-82100 を 1.5 g 塗布して同様の方法で鋳型を作製し、これを用いて鋳造した PDMS シートの流路断面の写真を図 3-8 に示す。流路高は 480 μm であり、膜を支える柱構造の底面が水平の流路を作製できた。このことから、液漏れ防止流路で用いることができる鋳型を作製できたと結論した。

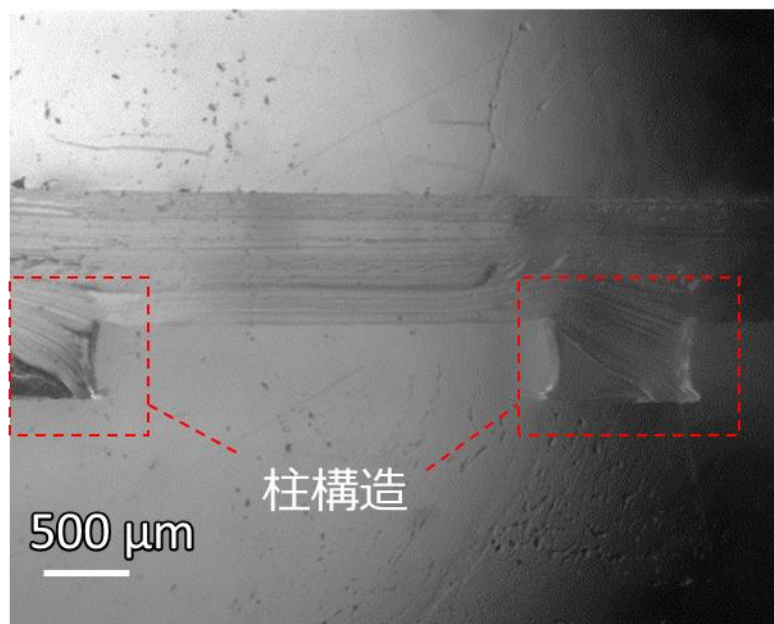


図 3-8 重量制御法によって作製した流路断面の写真

C) PDMS プレポリマーの導入による液漏れ防止の検討

B)に記した方法により透析部の周りに空洞の構造を持つ PDMS シートを作製した (図 3-9-a)。作製したシートの中に透析膜を 3 枚挟み込み、プラズマ接着して上下の流路を貼り合わせることで透析膜を挟み込んだ。その後、液漏れ防止流路の導入孔から PDMS プレポリマーを導入し、60°C、40 min 加熱することで硬化させた (図 3-9-b)。

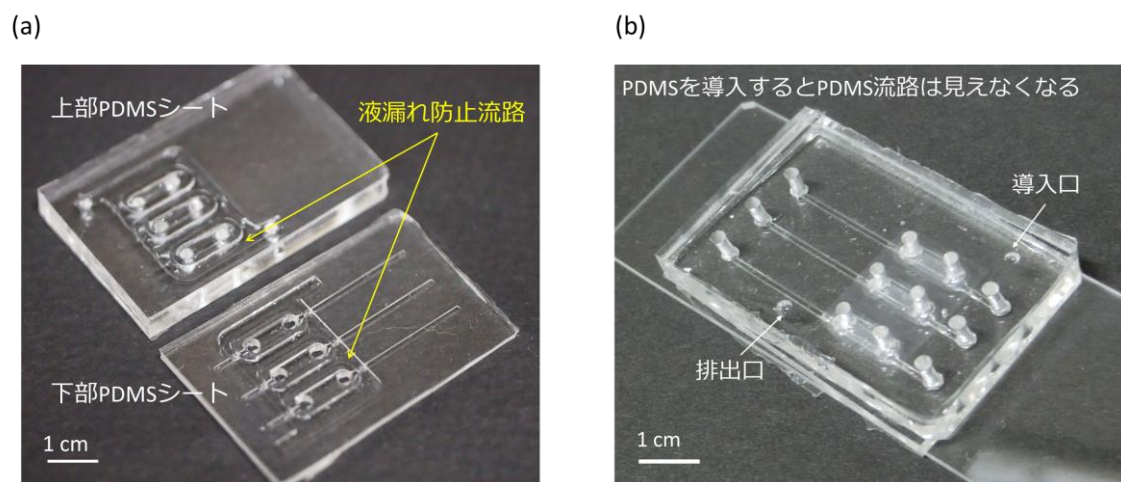
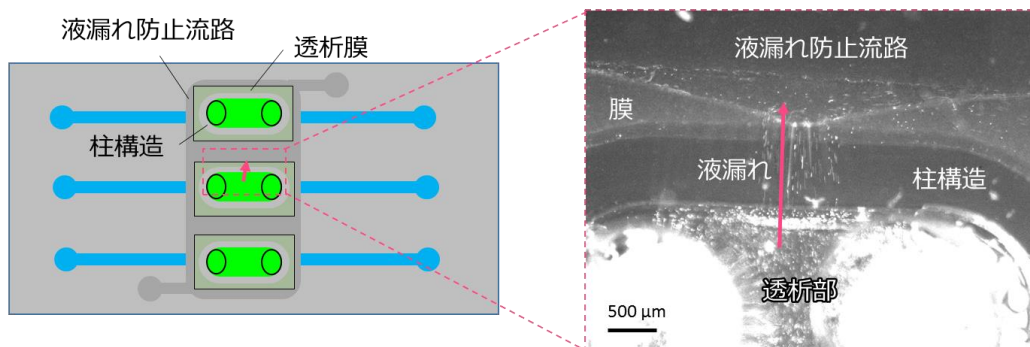


図 3-9 作製した液漏れ防止流路と PDMS プレポリマー導入後の写真

液漏れ防止流路への PDMS 導入によって流路間の液漏れを防止できるかを評価するため、1.0 μm 蛍光ビーズ懸濁液をチップに導入し、シリンジポンプを用いて上流路に 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ で送液しながら、透析部の蛍光ビーズの流れを蛍光顕微鏡で観察した。図 3-10 に透析部付近の蛍光写真を示す。蛍光ビーズは液漏れ防止流路に充填された PDMS の効果により流路へと漏れる事はなかったが、透析膜がたわむ事で上下の流路間で液漏れを生じる様子が観察された。これは乾燥状態の透析膜に水溶液が接すると透析膜が膨潤し、液漏れ防止流路に流し込んだ PDMS を押しのけてたわみ、この隙間から下流路へと漏れ出したと考えられる。そこで、PDMS の代わりに、エポキシ樹脂系のフォトレジストである SU-8 を液漏れ防止流路に導入し、ユニット間と上下流路間の液漏れの解決を試みた。

上面図

蛍光写真



断面図

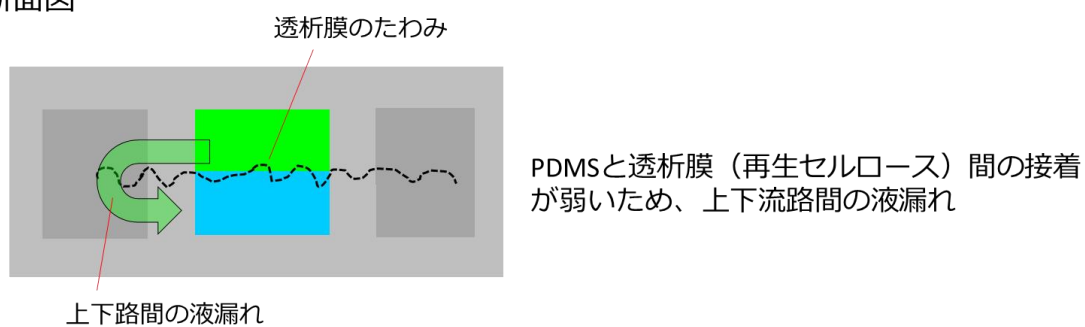


図 3-10 未固化 PDMS を導入した液漏れ防止流路での上下流路への液漏れ

D) SU-8 の導入による液漏れ防止の検討

液漏れ防止流路に SU-8 3025 を導入し、600 s 紫外線照射して液漏れ防止流路内の SU-8 を硬化させた。その後、蛍光ビーズを上流路に導入して送液した際の蛍光写真を図 3-11 に示す。透析部の蛍光ビーズは一方向へと流れ、溶液が流路外へと漏れる様子が確認されなかった。この事から、SU-8 によって接着した透析膜は接着状態を維持したと考えられ、液漏れ防止流路に導入するポリマーとして SU-8 を用いる事とした。

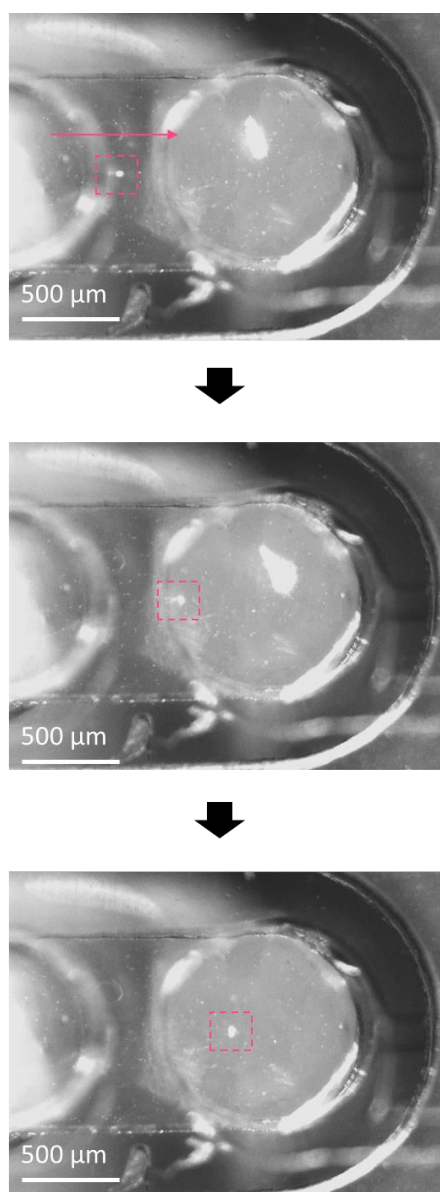
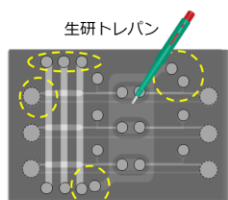


図 3-11 蛍光ビーズを上流路に導入して送液した際の蛍光写真

E) 流路が隣接する事に対する問題点と対策

集積化モデルでは1枚のチップ上に3ユニットの循環流路を集積化した設計のため、流路や垂直流路の密度が高くなる。垂直流路は生検トレパンを用いてPDMSシートに手作業で穴を開けて作製するため、流路が隣接していると作製が非常に困難になった。そこで、垂直流路の数を減らすために、ポンプの構造を変更した。従来のマイクロポンプは、ソレノイドバルブからのチューブを垂直流路に挿入し、出口をテフロン丸棒で塞ぐ構造であったため、3つの制御用流路には6つの垂直流路が必要であった。そこで、マイクロポンプの側面からチューブを挿入する構造に変更し、垂直流路の数を減らした。また、流路設計を垂直流路と他の流路が隣接しないように設計を見直し、集積化チップ作製における問題を解決した。(図 3-12)

集積化チップ作製の問題点



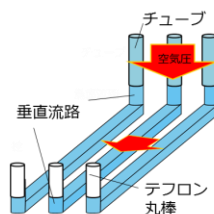
1枚のチップ上に
3ユニットの循環流路を集積化する設計



垂直流路と他の流路が隣接するため
垂直流路作製などの作製が困難

解決策

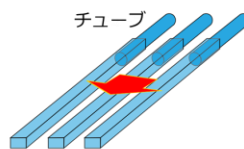
ポンプ構造の変更



ポンプで6個の垂直流路が必要

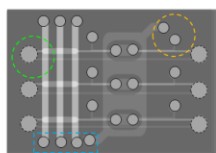


水平面から
チューブを
挿す方式に



垂直流路の数を削減

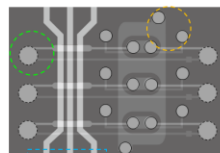
流路設計の見直し



流路感が隣接⇒作製が困難



垂直流路と流路を
隣接させないように



作製が容易に

図 3-12 流路を密集させないための設計変更

3-4 集積化モデルの作製

A) 鋳型の作製

目的のマイクロチップを作製するため、フォトリソグラフィ法により鋳型を作製した。作製したフォトマスクを図 3-13 に示す。効率化のため、1 枚のデバイス上に集積化モデルが 2 セット、つまり糸球体モデルを 6 ユニット構築した。

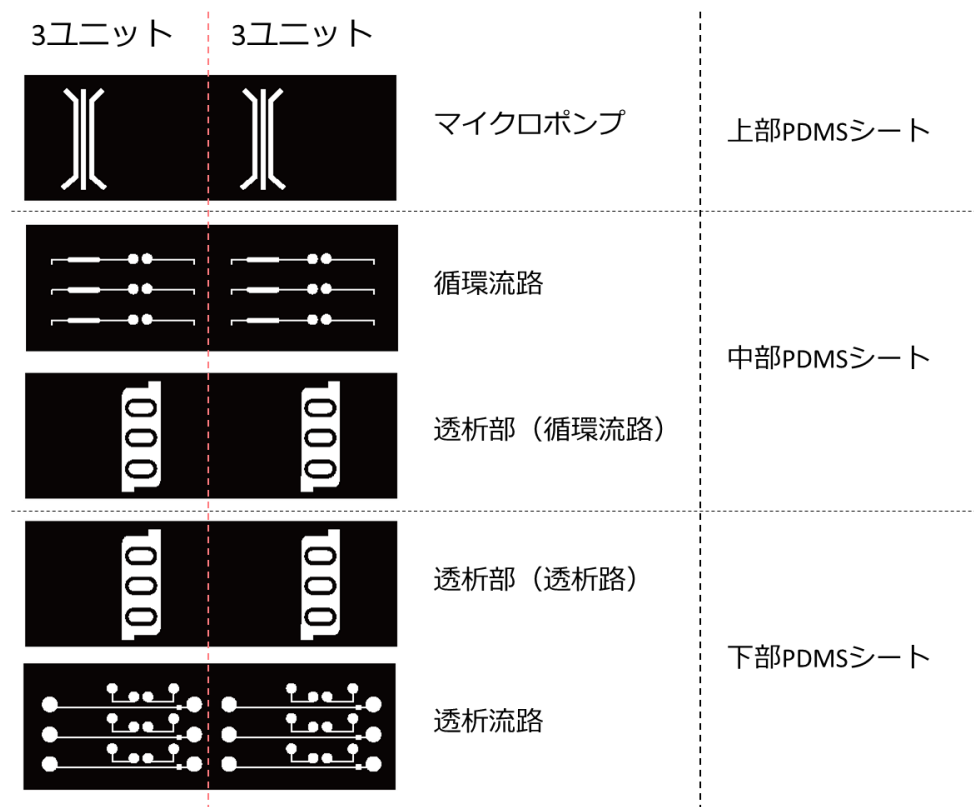


図 3-13 集積化モデルのフォトマスク

マイクロポンプの制御用流路、透析部、透析流路の鋳型は重量制御法を用いて作製した。SU-8 3025 をスライドガラスに塗布し、20 min 加熱後、レジストの上からフォトマスクを被せて流路部分を紫外線で 10 min 露光して硬化させた。その後、乳酸エチルを用いて未硬化部分を洗浄し、目的の流路高の鋳型を作製した。循環流路の鋳型は、裏面照射法を用いて断面が半円状の鋳型を作製した。

B) 集積化モデルの作製

集積化モデルはマイクロポンプ、循環流路、透析流路を含んだ上部、中部、下部の3層のPDMSシートで構成され、上部と中部のPDMSシートの上にPDMS薄膜を、中部と下部のシートの上に透析膜を挟み込んだ構造を持つ。流路構造及び各流路サイズを図3-14に示す。

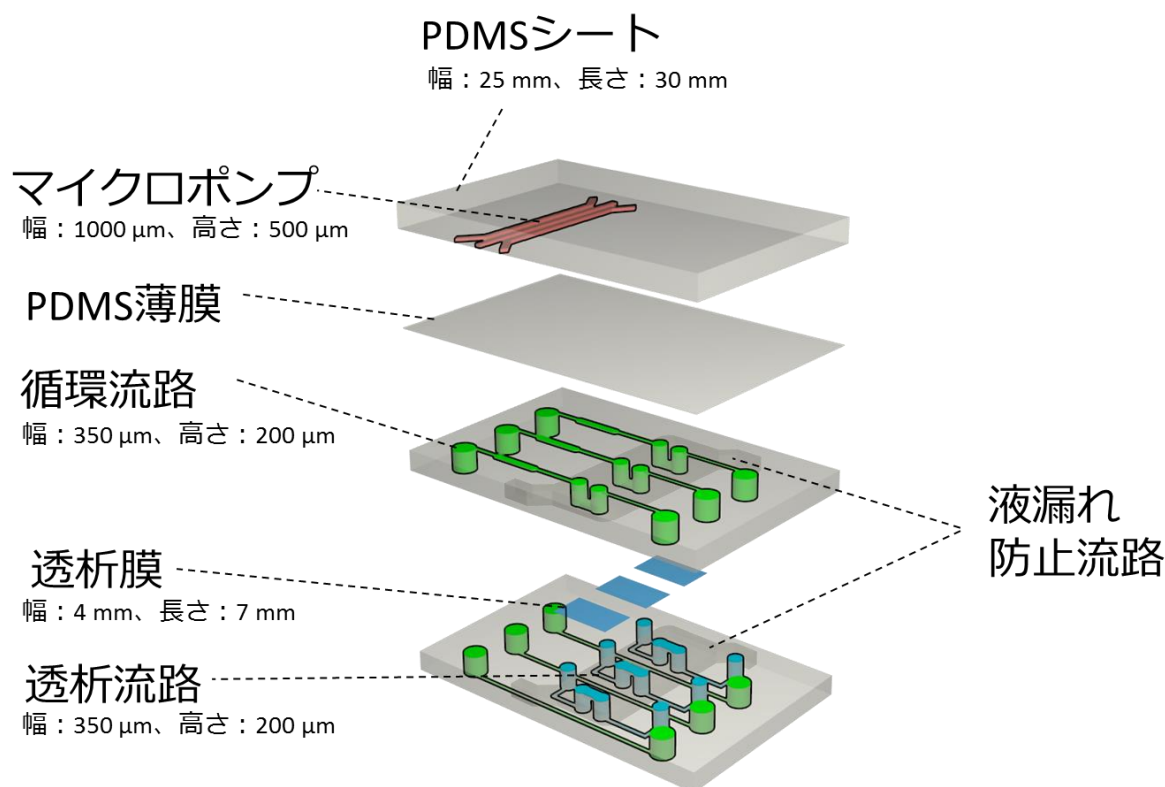


図 3-14 集積化モデルの設計

マイクロポンプを含む上部 PDMS シートを作製するため、マイクロポンプの制御用流路の鋳型を長さ 60 mm、幅 26 mm、高さ 4 mm のアクリル製の型にはめ込み、PDMS プレポリマーをアクリル枠に流し込んで 90°C、15 min 加熱した。鋳造した制御用流路に圧縮空気を送りこむためのチューブを接続するため、2 mm の生検トレパンを用いて接続部を作製した。この上部 PDMS シートと 2-3C) で示した方法で作製した薄膜をプラズマ接着し、マイクロポンプを内蔵した上部 PDMS シートを得た。中部と下部の PDMS シートは長さ 60 mm、幅 26 mm、高さ 1.5 mm のアクリル製の枠を用い、2-3B で示した方法で 2 枚の鋳型を向かい合わせにし、PDMS プレポリマーを枠内に流し込んで 80°C のオーブンで 15 min

加熱して鋳造した。それぞれの PDMS シートを貼り合わせた後、液漏れ防止流路に SU-8 3025 を導入して紫外線で硬化させることで、透析膜を接着させた（図 3-15）。

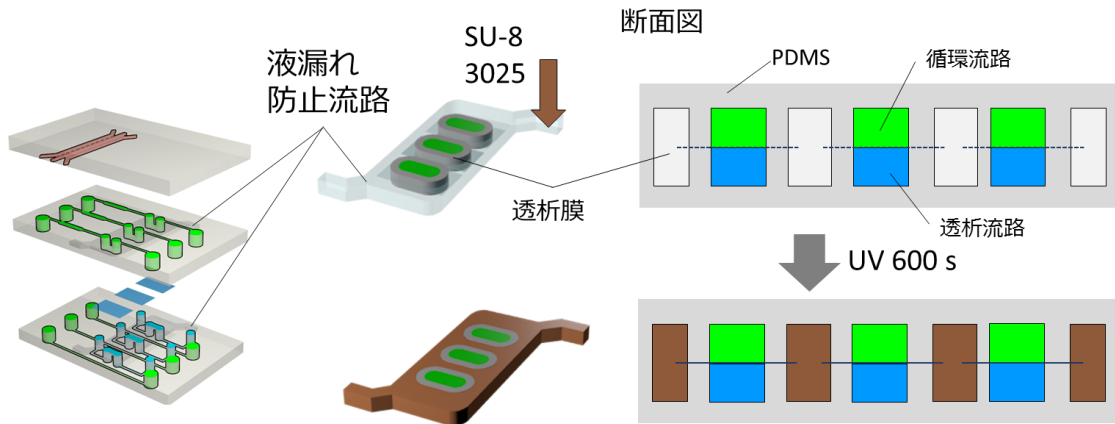


図 3-15 SU-8 を導入した液漏れ防止流路での透析膜の接着

作製したマイクロチップの写真を図 3-16 に示す。横 3.5 cm、縦 2.5 cm のチップ内に循環流路が 3 ユニット集積化されたマイクロチップの作製に成功した。

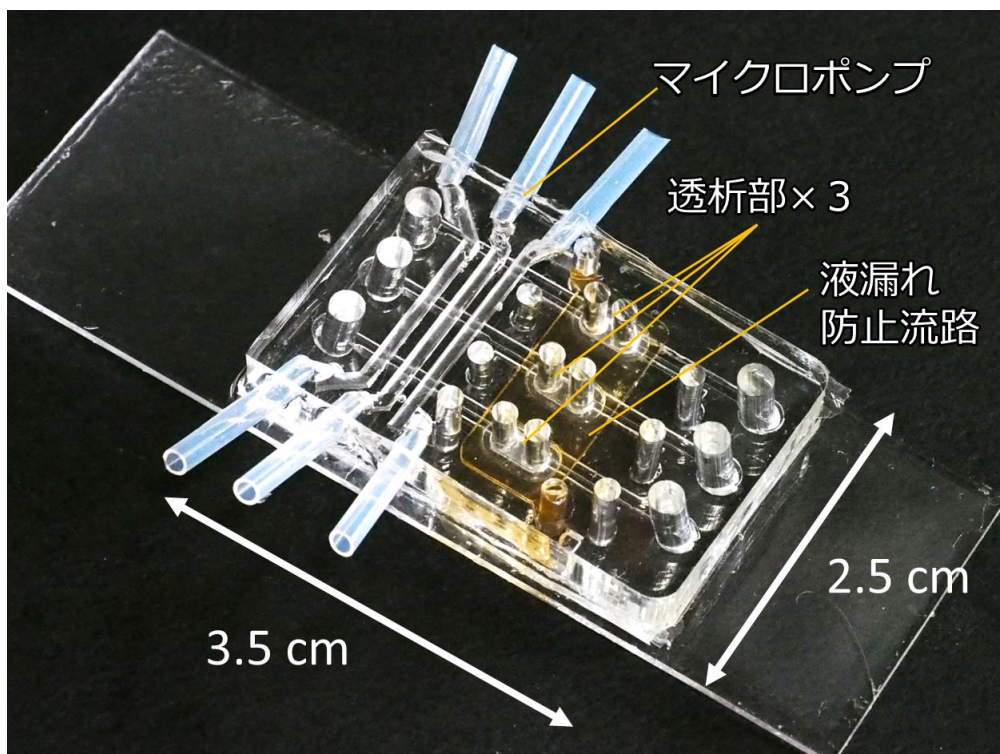


図 3-16 作製した集積化モデルの写真

3-5 集積化モデルのための実験系の構築

A) 送液系及びマイクロポンプ駆動系の構築

作製したチップに空気圧や透析液を送るための実験系を構築した (図 3-17)。圧縮空気のガスポンペをソレノイドバルブに接続し、マイクロポンプの3つの制御用流路と各ソレノイドバルブはテフロンチューブを介して接続した。ソレノイドバルブの開閉のタイミングをデジタルスイッチと PC で制御し、シリンジポンプは各透析流路にチューブを介して接続した。

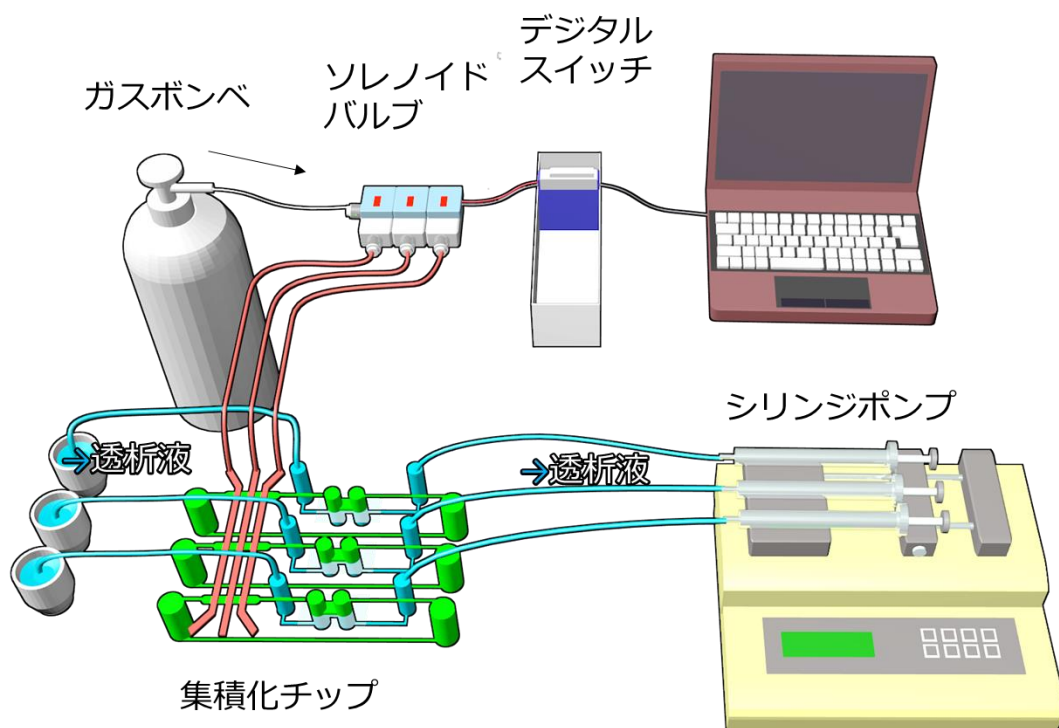
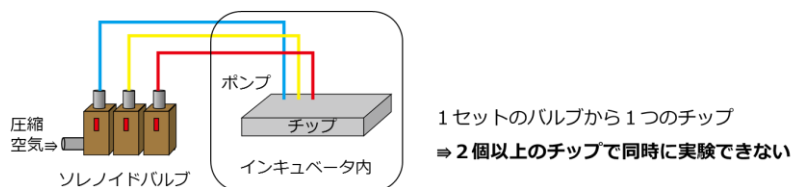


図 3-17 集積化チップのための実験系模式図

B) 並列化のための配線の改良

集積化モデルは3つのユニットの循環流路を有しているため、1つのマイクロポンプで3つの並列実験を行うことができる。しかし、ソレノイドバルブからマイクロポンプへ接続されるチューブは1枚のチップに1組しか配線できず、複数のチップで並列実験を行うことが出来ない。そこで、ソレノイドバルブからチップへの配線をインキュベータ内で8分岐させる配線を設計し、実験の効率化を試みた。分岐チップは高さ500 μm 、幅1mmのプラスチック棒を用いて作製した鋳型にPDMSを流し込んで作製し、チューブの分岐に用いた。作製した8連並列駆動のためのチューブ配線の模式図を図3-18に、写真を図3-19に示す。この配線により、8枚のチップのマイクロポンプを並列で駆動させるが可能となり、同時に24連の実験が行う事が可能となった。複数のチップのマイクロポンプを駆動させ、気体の漏れを調べた所、ほとんど漏れなくポンプを駆動させることができたため、実験の効率化が行えた結論した。

マイクロポンプへの配線



8個並列化した配線の設計

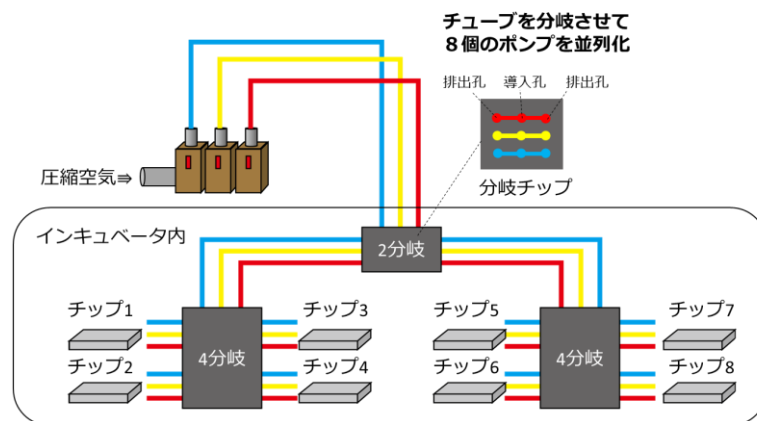


図3-18 並列化のためのマイクロポンプ配線の設計

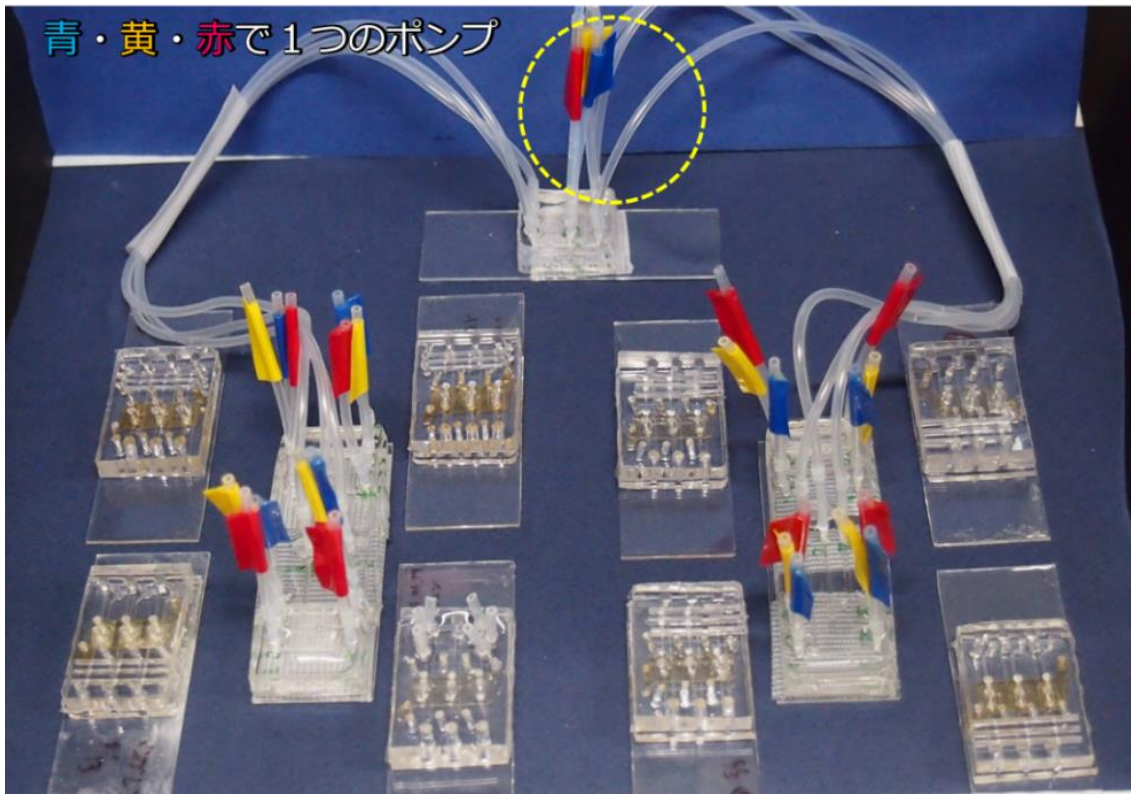


図 3-19 並列駆動のための配線とチップの写真

3-6 マイクロポンプによる流速制御と循環流路の並列循環

A) マイクロポンプの原理と課題

マイクロポンプには Unger らによって報告された方法を用いた[57]。図 3-20 にマイクロポンプの原理図を示す。マイクロポンプは循環流路の真上に位置し、循環流路と PDMS 薄膜を介して接しており、マイクロポンプに空気圧を加える事で PDMS 薄膜が膨張し、循環流路を天井から順番に押しつぶす機構になっている。しかし、従来の糸球体モデルでは押しつぶす際の溶液の揺れ戻りが大きく、流速の制御を行うことが出来なかった。そこで、本研究ではこの問題を解決し、さらに 1 つのマイクロポンプで 3 つのユニットの循環流路の流速を制御することを目指した。

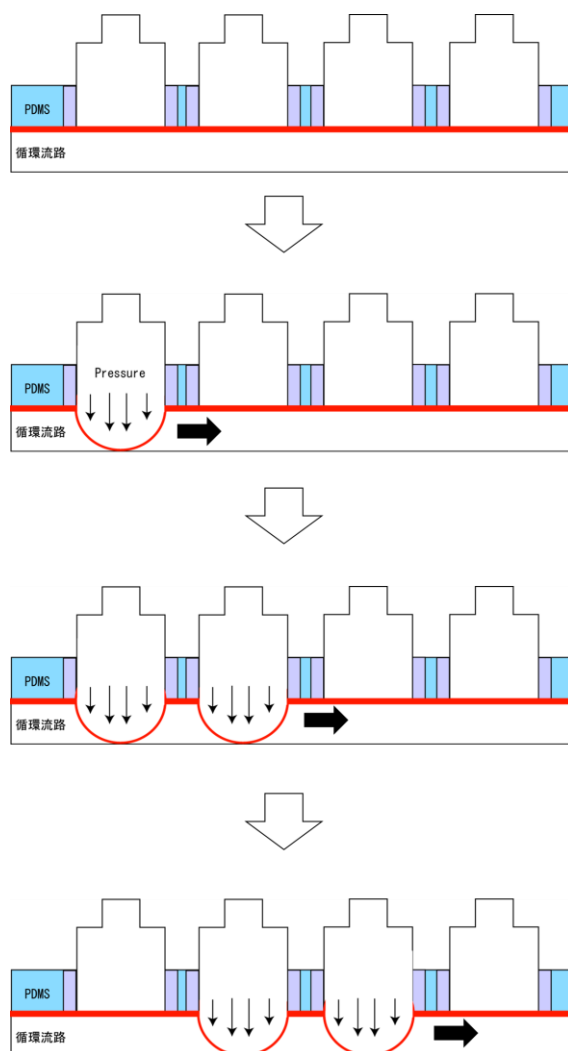


図 3-20 マイクロポンプの原理図

循環流路の断面が長方形の流路と半円状の流路にフルオレセイン溶液を満たし、それぞれマイクロポンプによって加圧した時の流路底面からの蛍光写真を図 3-21 に示す。断面が四角形の流路では、PDMS 薄膜が膨張して循環流路を押しつぶす事によって流路中央ではフルオレセインの蛍光が消えているが、流路の壁面付近で蛍光が確認され、流路の角の押し潰しが不十分である事がわかる。一方で、断面の形状が半円状の流路は両脇の蛍光がほとんど確認されない結果となった。従って、流路断面形状を半円形にする事で、従来モデルで実現できなかった流速の制御を実現できると結論した。半円状の循環流路の作製には 2-2B) で示した裏面照射法を用いた。

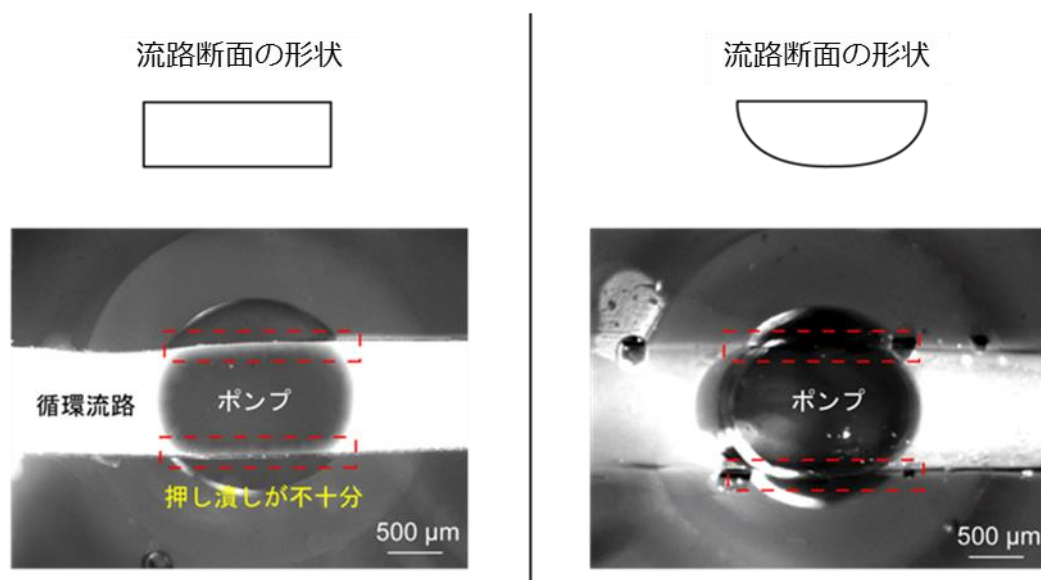


図 3-21 マイクロポンプによる循環流路の押し潰し

B) 流速の測定

作製したマイクロポンプでの溶液の循環を観察するため、流れの様子をマイクロ PIV (Particle Image Velocimetry) 法で解析した。循環流路に直径 $1\ \mu\text{m}$ の蛍光微粒子 (Fluoresbrite YG Microspheres $1.00\ \mu\text{m}$, Polysciences) の懸濁液を導入し、ポンプを駆動させながら、蛍光顕微鏡を用いて動画を撮影し、蛍光微粒子の動きを解析した。なお、流路壁面への蛍光微粒子の吸着を防ぐため、流路内壁はあらかじめ 2.2% ヒドロキシエチルセルロース水溶液を用いて 2 時間コーティングを行ってから実験に用いた。ポンプを駆動させる事で、循環流路内の蛍光ビーズは脈流になりながら一方向へと流れた。この時、ビーズが揺れ戻る様子が観察されたが、一回の加圧で進む距離の方が揺れ戻る距離よりも十分大きく、全体として一方向への溶液の循環が行えた。マイクロポンプの駆動周波数を変化させながら、3 ユニットの循環流路内の流速を測定した結果を図 3-22 に示す。

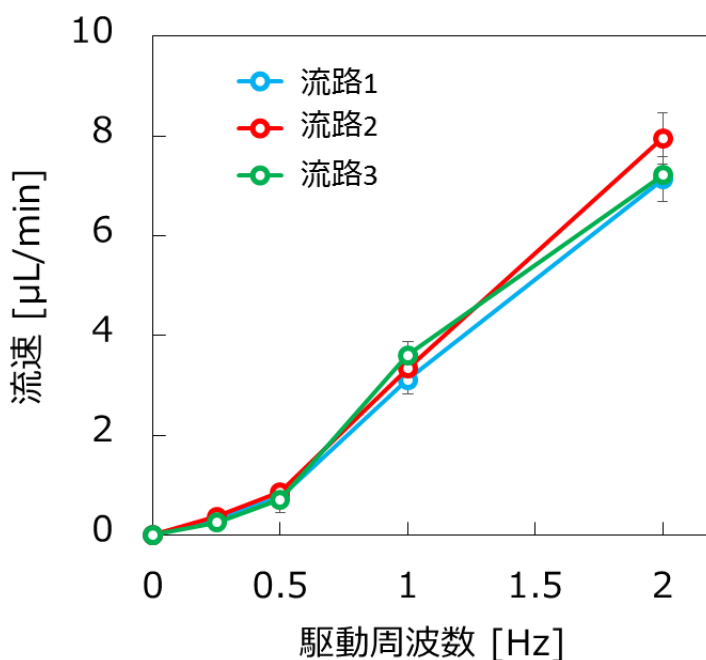


図 3-22 ポンプの駆動周波数と各循環流路での流速

循環流路内の溶液の流速は、マイクロポンプの駆動周波数を大きくするにつれて流速がほぼ直線的に速くなる結果となり、駆動周波数 0.25 Hz~2 Hz において 0.3~7.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ の範囲で流速制御が行えた。また、各ユニットの循環流路の差も少なく、1つのマイクロポンプで3つの循環流路を並列して循環させる事ができるモデルを開発できたと結論した。従来のモデルでは最大流速が 0.012 $\mu\text{L}/\text{min}$ だったのに対して[55]、今回ポンプの駆動周波数を 2Hz のときの流速は 7.4 $\mu\text{L}/\text{min}$ と非常に速い流速を実現した。これは、流路断面の構造を変化させたことで揺れ戻りが少なくなった事が大きく寄与していると考えられる。

この 2 Hz の時の流速でマイクロポンプを駆動させると 11 秒で循環流路を一周する事になり、従来モデルの一周 100 min と比較すると非常に短くなっている。心臓から送られた血液が体内循環する時間は、7~13 s と報告されており[58]、体内循環時間の観点では本研究で開発したマイクロポンプでの 10 数秒の循環時間は、従来のモデルよりも優れていると結論した。

3-7 集積化モデルでの並列した透析実験

開発した集積化糸球体モデルでは、循環流路と透析流路の間に挟み込まれた透析膜を用い、マイクロポンプによって循環している溶液に含まれる高分子化合物と低分子化合物の分離を行う。糸球体モデルでの低分子と高分子の分離は既に達成されているが、測定に煩雑な操作が必要な事や実験系が複雑であり複数回の実験が困難であるため、実用的でないという問題があった。そこで、本研究では集積化させたモデルでの透析実験を行い、モデルの集積化による実験の効率化を目指した。

集積化モデルでの並列した透析実験を行うため、3つの循環流路に DMEM に溶解した 100 μ M FITC-アルブミン (MW: 68 kDa)、または 100 μ M フルオレセイン (MW: 380 Da) を導入し、3つのユニットの循環流路を並列して駆動させた。一方、透析流路にはシリンジポンプを用いて培地を 42 μ L/h で送液した。温度と湿度を一定に保つため、実験は各種チューブと接続したまま 37°C の CO₂ インキュベータ内にチップを静置して行った。蛍光顕微鏡を用いて循環流路内の濃度変化を測定した結果を図 3-23 に示す。

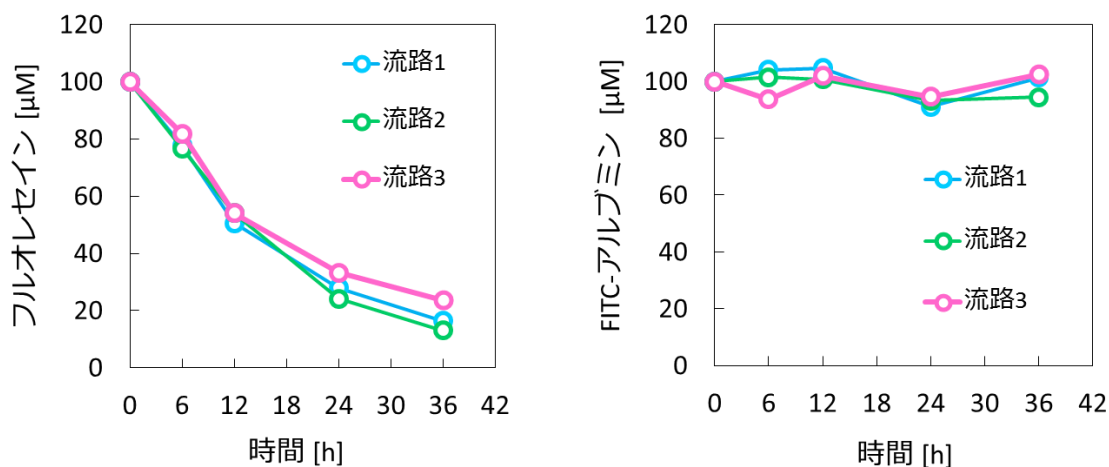


図 3-23 集積化糸球体モデルでの透析実験における循環流路中の化合物の濃度変化

低分子のフルオレセインの濃度は 100 μM から徐々に下がり、36 時間で約 20 μM まで減少した。一方で、高分子の FITC-アルブミンは初濃度の 100 μM からほとんど変化せず、36 時間後も循環流路内の濃度は 100 μM を維持した。このことから、低分子のフルオレセインは透析部の透析膜を介して透析流路へと排泄される一方で、高分子のアルブミンは循環流路内に保持されたと考えられ、糸球体の限外濾過による低分子化合物のサイズ選択的な排泄と一致した結果が得られた。

また、3つのユニットの循環流路内の濃度変化を比較すると、フルオレセイン、アルブミン共に流路間での差は少なく、従来の 3 倍の実験効率を実現したと評価した。マイクロ糸球体モデルでの透析実験は、温度を一定に保ち、溶液の蒸発を防ぐために CO_2 インキュベータ内で静置し、測定のために蛍光顕微鏡へとチップを移動させる。この際、チップは各種チューブと接続されたまま移動させる事になり、このような煩雑な操作は糸球体モデルにおける並列実験の妨げになっていた。このような問題はマイクロチップに関わる研究分野全体でも問題となっている。一般に、マイクロチップを用いた実験は、チップ自体は既存実験法で用いられている器具よりも小さいために高価な試薬や細胞の使用量が少ない事が利点となっているが、チップ内の微小流体操作を行うための装置を含めると非常に大きくなり、取り扱いが難しくなるために、マイクロチップを用いた試験法が主流の試験法になるための大きな障害となっている。このような事から、本研究での集積化モデルで用いたポンプによる複数の流路の並列駆動による透析実験は、糸球体モデルの開発という事だけでなく、将来的に臓器モデルなどのマイクロチップを実際に試験法として使う際の装置化技術の観点でも有用であると考えられる。

3-8 集積化マイクロ糸球体モデルを用いた抗がん剤のアッセイ

A) アッセイの原理

集積化モデルを用いてタンパク質結合性の異なる抗がん剤のバイオアッセイを行った。チップ内の培養槽に薬剤の標的となるがん細胞を培養し、血清を含んだ培地に抗がん剤を溶解して循環させる。タンパク質結合性の低い薬剤は透析部において循環流路から透析流路へと排泄され、タンパク質結合性の高い薬剤は血清中のタンパク質に結合して循環流路内に残留する。その結果、標的細胞には体内の残留性が反映された形で薬剤が作用するため、腎排泄を考慮した抗がん剤バイオアッセイが行えると考えられる。本研究では抗がん剤として血漿タンパク質結合性薬剤ドセタキセルと血漿タンパク質非結合性薬剤チオテパを用い、標的細胞にはヒト乳がん由来細胞株 MCF-7 細胞を用いた。抗がん剤と標的細胞の詳細は 2 章に示した。

B) 集積化モデルの培養槽での MCF-7 細胞の培養

集積化モデル内に MCF-7 細胞を培養した際の生存率を見積もるため、抗がん剤を添加せずに MCF-7 細胞を培養した。あらかじめコラーゲンでコーティングし、培地を満たした培養槽に 2-5E) に示した方法で調製した MCF-7 細胞の細胞懸濁液を培養槽に 2 μL 添加してインキュベータ内で一晩静置した。MCF-7 細胞が培養槽に接着した後、培養槽の導入孔を 3 mm のテフロン丸棒で塞ぎ、循環流路内の培地内の培地をマイクロポンプを用いて循環させた。また、透析流路にはシリンジポンプを用いて培地を 42 $\mu\text{L}/\text{h}$ で送液しながら培養した。培養槽内の MCF-7 細胞は、播種直後は丸みを帯びた形状をしており、培養槽に接着すると周囲に足を伸ばし、扁平形となった。チップで 72 時間培養した後の MCF-7 を Live/Dead した蛍光写真を図 3-24 に示す。

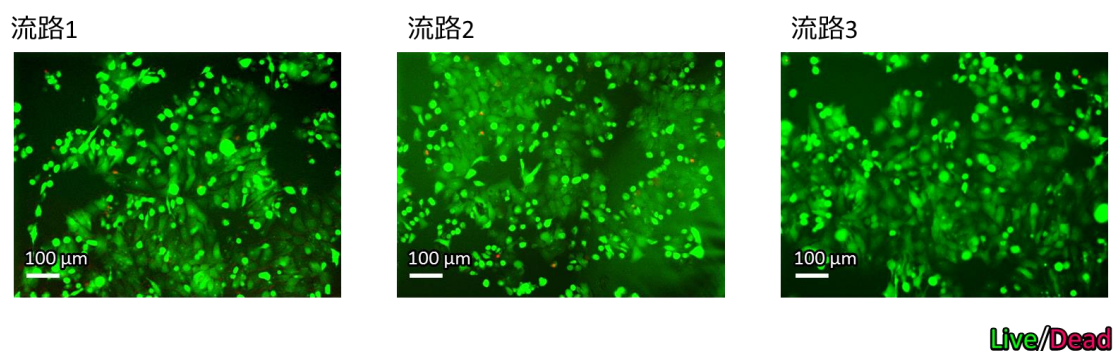


図 3-24 72 時間培養後の MCF-7 細胞の Live/Dead 染色

MCF-7 の死細胞率は 72 時間培養後で $3 \pm 1\%$ 以下であり、集積化モデルの循環流路で 72 時間溶液を循環させ続けても、栄養欠になるなどの細胞の生存に悪影響がない事が示された。開発したモデル内で問題なく培養が行えたため、次に抗がん剤のアッセイを行った。

C) 抗がん剤アッセイの評価

集積化糸球体モデルを用いて抗がん剤試験を行うため、MCF-7 細胞を培養槽に接着させたチップの循環流路内の培地を、20 μM ドセタキセル、もしくは 1000 μM チオテパを含む培地にそれぞれ置換した。その後、マイクロポンプを用いて循環流路内の抗がん剤を含む培地を循環させ、一方透析流路には抗がん剤を含まない流路を送液した。抗がん剤を 36 時間反応させ、Live/Dead 染色した細胞の蛍光写真を図 3-25 に示す。

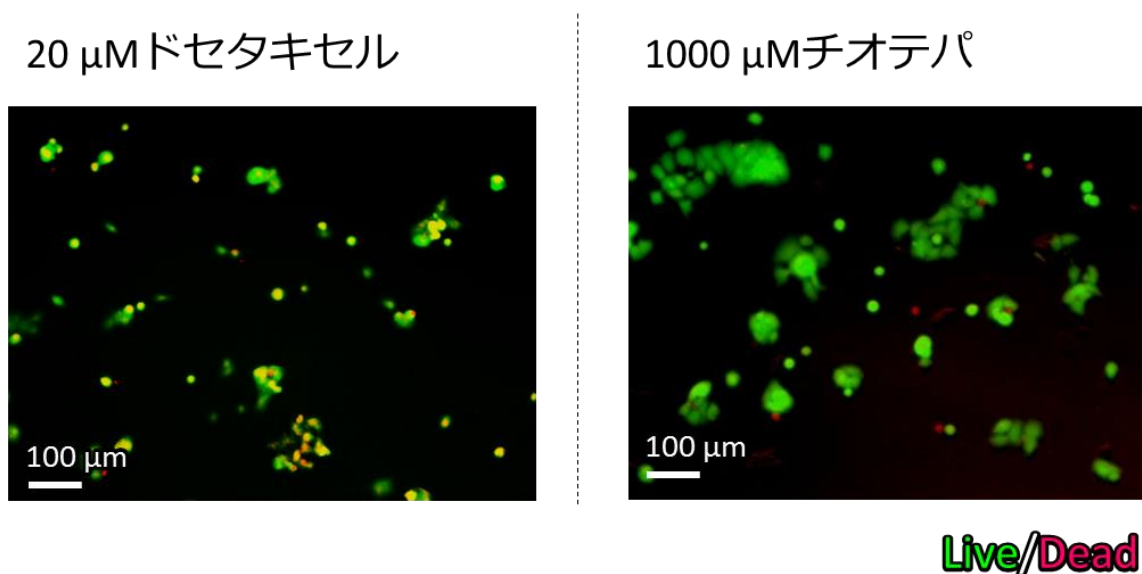
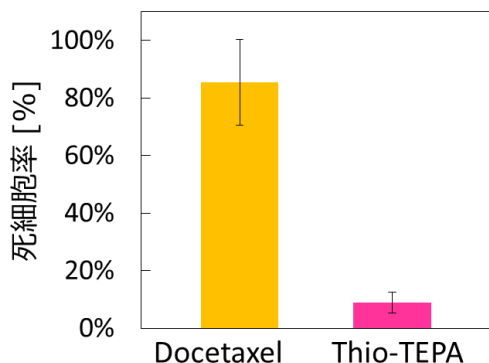


図 3-25 抗がん剤を 36 時間反応させたアッセイ後の MCF-7 の Live/Dead 染色

ドセタキセルを循環させた培養槽の MCF-7 細胞には赤く染色された死細胞の核が多く見られ、ドセタキセルが MCF-7 細胞に強く作用し、細胞死を促した事が示された。一方で、チオテパを循環させた培養槽の MCF-7 細胞では死細胞の核はあまり見られなかった。図 3-26 にドセタキセルとチオテパによる MCF-7 細胞の死細胞率を示す。

(a) 透析あり



(b) 透析なし

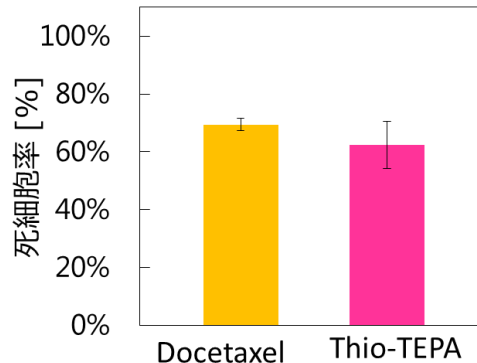


図 3-26 集積化糸球体モデルでの抗がん剤アッセイの結果

マイクロ糸球体モデルの透析部において、透析がおこる条件で抗がん剤試験を行ったところ、ドセタキセルの死細胞率は約 80%と高い一方で、チオテパの死細胞率は約 10%と低かった。これはタンパク質結合性の高いドセタキセルは、血清中のタンパク質と結合しているため、透析膜を通過できずに循環流路内に残留し、タンパク質結合性の低いチオテパは透析膜を通りぬけて循環流路から徐々に排泄された結果だと考えられる。

得られた死細胞率の差がタンパク質結合性に起因する事を確かめるため、透析部を PDMS で満たして透析膜で物質の移動が起こらないモデル（透析なし）を作製して同様の実験を行った。36 時間後の死細胞率を図 3-26b に示す。透析が起こらない条件では、ドセタキセル、チオテパ共に死細胞率が約 60%と高い値を示した事から、チオテパの抗がん活性は透析部から排泄されなければドセタキセルと同様であると考えられるため、透析が起こる条件でのアッセイの結果はタンパク質結合性の違いを反映していると考えられる。

D) 単一モデルとの抗がん剤アッセイの比較

3連の集積化モデルを用いた時の再現性を1連の系と比較するため、集積化モデルの1ユニットと体積や構造が同じ単一のモデルを作製し、アッセイの結果を比較する事を試みた。単一モデルは、マイクロポンプを循環流路の真上に設置し、循環流路、透析部の設計値は集積化モデルの1つのユニットと同様になるように設計した(図3-27)。1回の作製工程で4つの単一モデルの作製が行えるようにフォトマスクを設計し、作製したPDMSシートを4つに切り分けて単一モデルを作製した。作製したチップの写真を図3-28に示す。

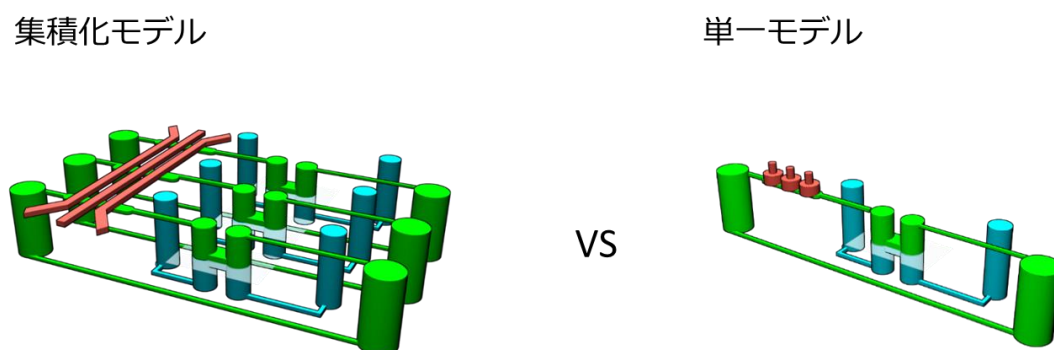


図 3-27 集積化モデルと単一モデルの模式図

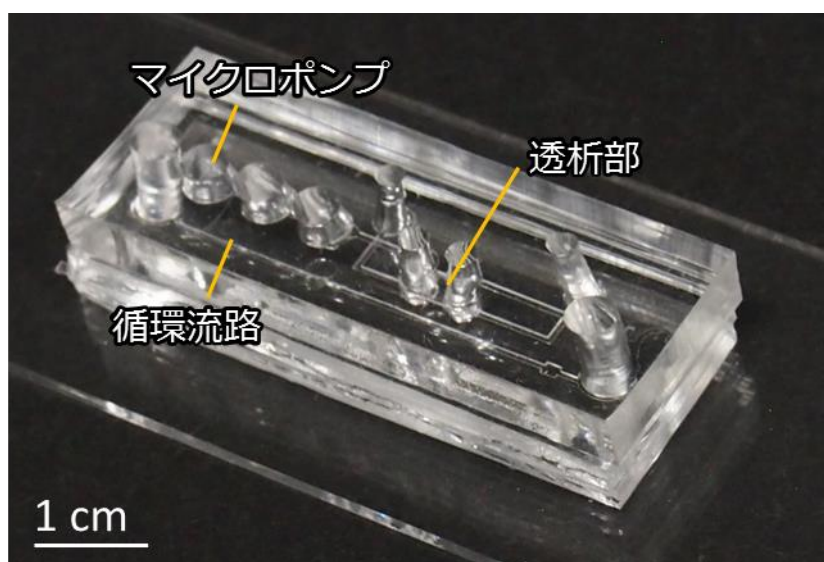


図 3-28 作製した単一モデル

単一モデル内に MCF-7 を接着させ、集積化モデルと同様の手順・条件でドセタキセル、チオテパを循環流路に循環させ、培地を透析流路へと送液した。ドセタキセル、チオテパを循環流路にそれぞれ 36h 循環させた後の MCF-7 の死細胞率を図 3-29 に示す。

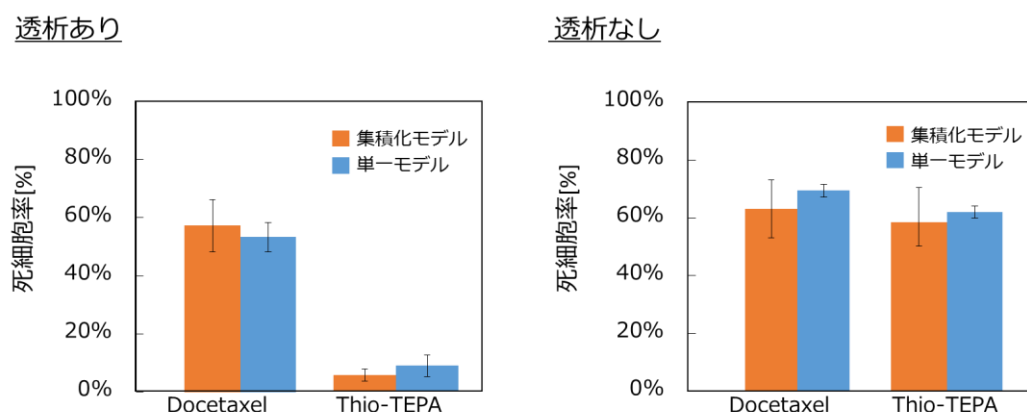


図 3-29 集積化モデルと単一モデルの抗がん剤アッセイの比較

単一モデルのアッセイの結果についても、透析が起こる条件ではドセタキセルの死細胞率に比べてチオテパでは低い値を示し、一方透析が起きない条件ではどちらの抗がん剤も死細胞率 60%と高い値を示し、死細胞率が両方で集積化モデルと一致した傾向を示した。このことから、集積化モデルは単一モデルと同様の性能を有していると考えられ、1 回の操作で 3 倍の効率化が行えていることが示された。

E) 集積化モデルでのアッセイの評価

本研究では、従来のマイクロ糸球体モデルではマイクロポンプの流速が制御できないために体内の減衰過程を再現できていない問題や、チップの作製やアッセイでの煩雑な操作により、アッセイの再現性が低い問題を解決するため、集積化モデルの開発を行った。流速が制御できない問題は循環流路断面の形状を検討し、幅広い範囲で流速の制御が行えた。その結果、溶液が流路を一周する循環時間は従来のモデルよりも大幅に人体内の循環時間と近づける事ができ、モデルの改良が行えた。集積化モデル、透析実験やアッセイを並列して行うことができるようになり、アッセイの再現性を大幅に向上させることができた。このような研究はマイクロチップの分野が抱える煩雑な送液系による操作の煩雑さを解決しうる 1 つの手段として有効であると考えられる。

3-9 実用的なアッセイへの課題

A) マイクロポンプのポータブル化

本研究ではアッセイや透析実験の効率化のためにチップの設計や実験系の改良を行った。しかし、インキュベータ外部から接続されたチューブを接続したままチップを出し入れするという煩雑な操作の根本的な問題の解決には至っていない。その原因の 1 つとして、チップ内で細胞を培養する必要からチップはインキュベータ内と同様の環境に長時間静置する必要がある一方で、チップ内の溶液を制御する装置は外部電源などが必要である事が挙げられる。このため、将来的にはマイクロチップ実験系の全てを 1 つの小型装置内に組み込む必要があると考えられる (図 3-30)。本研究ではその一端としてマイクロポンプのポータブル化に取り組むこととした。

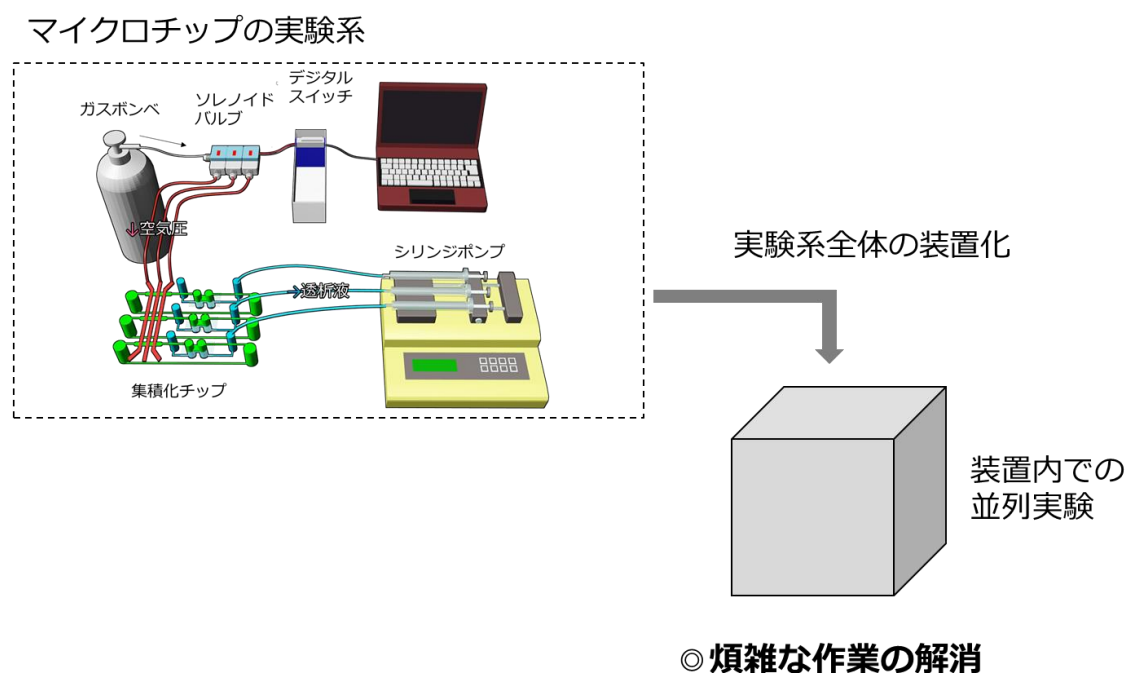
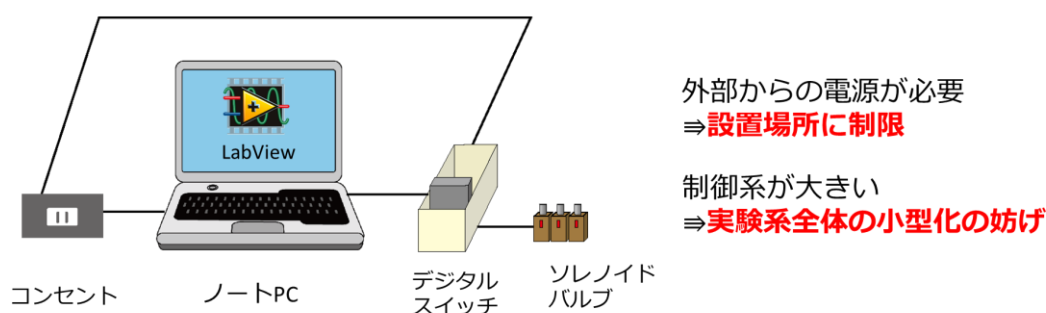


図 3-30 マイクロ系球体モデルの実験系の装置化の概念図

マイクロポンプを駆動するための空気圧を制御するソレノイドバルブには、開閉のタイミングを制御するデジタルスイッチ及び Lab view を搭載した PC が接続され、それぞれが電源を必要とするために小型の装置内に組み込む際の大きな制限となっている。そこで、ソレノイドバルブを小型のマイコンで制御し、それぞれの電源をバッテリーから供給できれば、外部からの電源を必要としないマイクロポンプの制御系が開発できると考えた (図 3-31)。

一般的なマイクロポンプの制御系



ポータブル化に向けてマイコンを用いた制御系

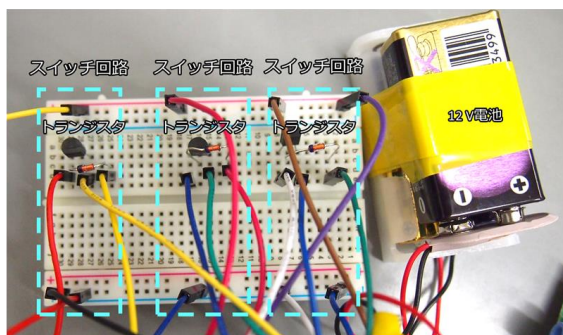
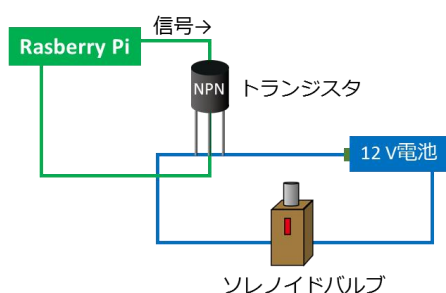


図 3-31 マイクロポンプポータブル化のメリット

マイコンには Raspberry Pi type B を使い、図 3-32 に示すトランジスタを用いたスイッチ回路を作製した。ソレノイドバルブの開閉には 12 V の電圧が必要であるため、Raspberry Pi からの電流 5V の電圧で直接制御することができない。そのため、トランジスタをスイッチ回路として使い、12 V 電池からの電流を間接的に制御した。Raspberry Pi のプログラミング言語には Python を使い、ソレノイドバルブの開閉のタイミングを制御した。図 3-32 に作製したスイッチ回路とソレノイドバルブの写真を示す。Raspberry Pi をバッテリーに接続することで、ソレノイドバルブはプログラミングした周波数で駆動した。この制御系は、従来の Lab view を用いたノート PC 及びデジタルスイッチの制御系と比較して大幅に小型化されており、外部の電源も必要としないため、目的とするマイクロポンプの制

御系を開発できたと結論した。

トランジスタを用いたスイッチ回路



作製した外部電源が不要なソレノイドバルブ制御系

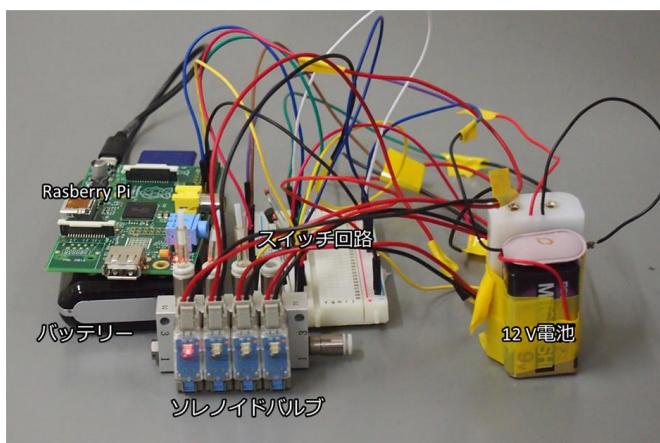


図 3-32 作製したソレノイドバルブの回路及び制御系

現在は、ソレノイドバルブの制御系の小型化に留まっているが、今後外部から送液を行うシリンジポンプ、空気圧の供給源であるガスボンベなどの実験系を1つの装置内に組み込むことができ、集積化チップで検討した並列化と共に、マイクロチップを用いたアッセイの実用化やハイスループット化に大きく貢献できるものと考えられる。

B) 人体の腎排泄に近づけるための課題

本研究では、循環流路内の循環時間を人体に近づけ、従来のモデルでの課題であった体内の薬剤が徐々に排泄されていく過程の模倣に成功した。しかし、体内での腎排泄過程に近づけるためには、数多くの課題が存在すると考えられる。その1つとして挙げられるのは、臨床でのデータとの比較である。本研究ではモデル化合物としてフルオレセインを用いて、循環流路からの排泄を測定した。しかし、このようなモデル化合物での排泄実験では、臨床において用いられているデータと直接比較することが難しい。このため、今後は腎クリアランス評価に用いられているイヌリンやクレアチニンなどの化合物を用いての排泄実験を行い、ヒト体内での薬剤の腎排泄を予測するための検討が必要となると考えられる。また、本研究では透析部で糸球体濾過のみを模倣しているが、1章で述べたように薬剤は糸球体濾過だけでなく、再吸収・分泌の過程の影響も受ける。このため、今後は糸球体に加えて尿細管の機能を模倣した部位の開発が望まれる。

4 章 マイクロ糸球体モデルにおける排泄速度の基礎検討

4-1 序論

本章ではマイクロ糸球体モデル内から低分子化合物が排泄される際の排泄速度の基礎検討を行う。これまでマイクロ糸球体モデルにおいては透析部での高分子化合物と低分子化合物の分離など糸球体の基本的な機能を実現してきたが、低分子が排泄される際の速度について検討が行われてこなかった。低分子の消失速度は薬剤の残留性に関わる重要なパラメータである事から、マイクロ糸球体モデルにおいて排泄速度を求めるための検討が必要となると考えた。そこで、本章では臨床において糸球体での排泄速度の検査に用いられているイヌリンを用いて、マイクロ糸球体モデルにおける排泄速度を求め、腎臓での排泄速度に近づけるための膜面積や流路体積などの検討を目的とした。

4-2 マイクロ糸球体モデルでのイヌリンの定量

A) イヌリン

イヌリン (図 4-1) は糸球体で濾過され、尿細管での分泌や再吸収を受けずに尿中に排泄される。このため、採尿されたイヌリンの消失速度などを求めることで、腎不全などの検査が行われている[59,60]。また、静脈投与されたイヌリンは 10 時間以内までに殆どが尿中へ排泄されるため[61,62]、マイクロ糸球体モデルにおけるイヌリンの排泄も 10 時間以内に完了させる事を目標とした。

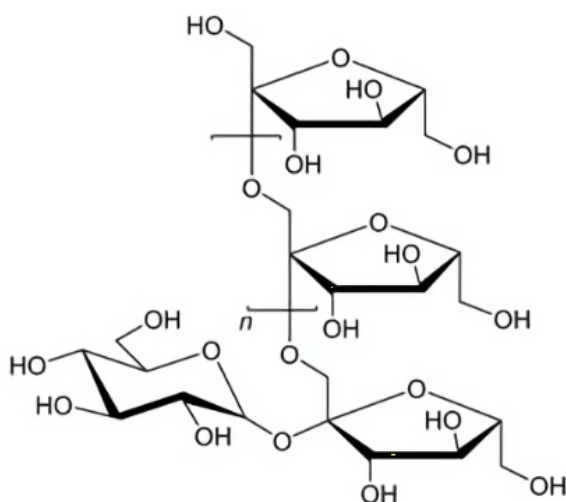


図 4-1 イヌリンの構造式

B) イヌリン定量チップの設計・作製

マイクロ系球体モデルを用いてイヌリンの排泄速度を求めるため、図 4-2 に示すチップ及び実験系を設計した。マイクロポンプによって循環流路内を循環したイヌリンは、透析部において透析流路へと排泄される。シリンジポンプによって透析液を送液し、透析部を通過した透析液を回収した後、ELISA によるイヌリン定量キットを用いて透析液中のイヌリンを定量した。

膜面積や流路体積を幅広く検討する際に 3 章で開発した集積化されたモデルは検討に向かないと考え、本実験には簡便な設計のものを用いた。

フォトリソグラフィ法によって鋳型を作製した後、チップを作製した。チップの写真を図 4-3 に示す。透析部付近の液漏れを防ぐために、液漏れ防止流路を設けた。

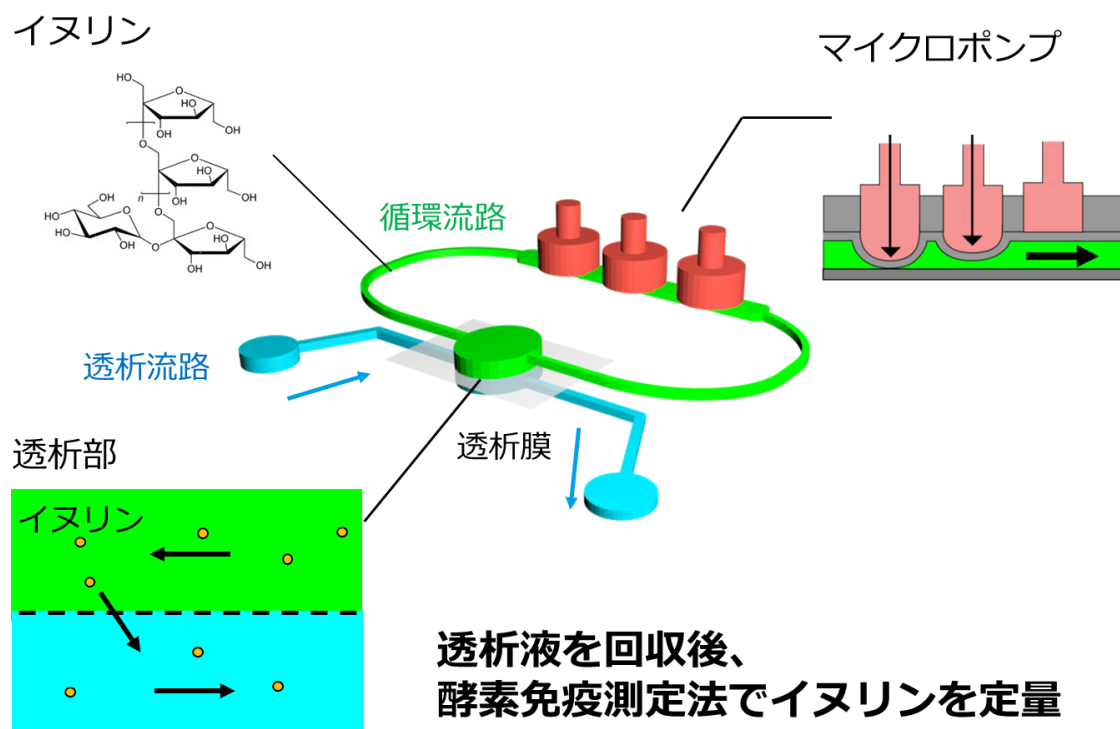


図 4-2 イヌリンクリアランスチップの概略

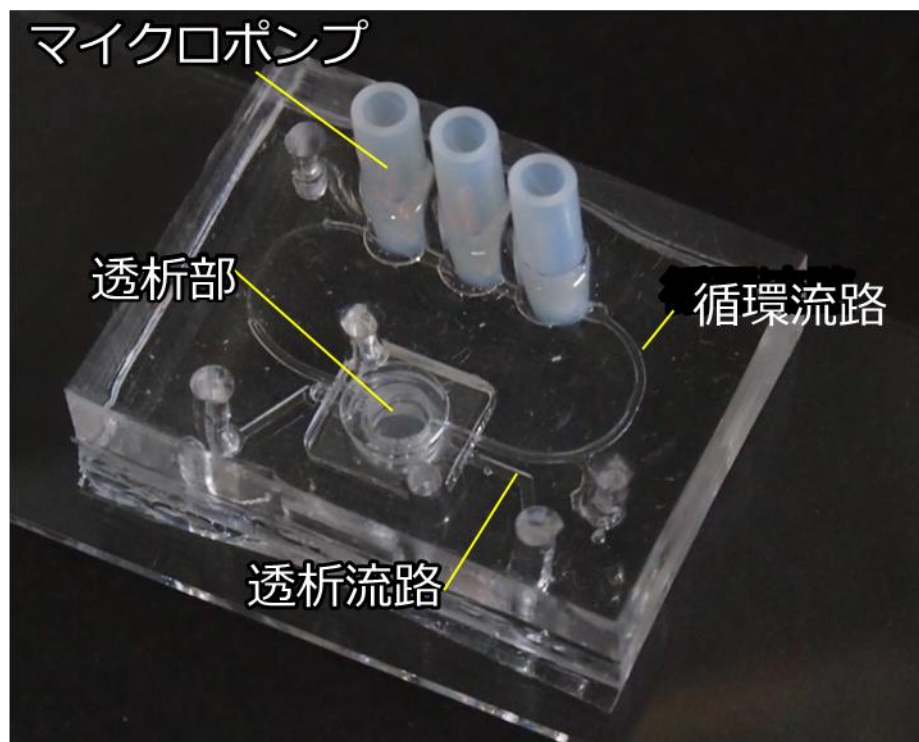


図 4-3 作製したイヌリンクリアランスチップの写真

C) イヌリンの検量線の作成

チップから排泄されたイヌリンを定量するため、検量線の作成を行った。イヌリンの定量原理及び操作は 2-8 に示した。0.05、0.1、0.5、1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のイヌリン溶液を調製し、反応を行った後プレートリーダーを用いて 450 nm の吸光度を測定した結果を図 4-4 に示す。本測定法は競合 ELISA 法であり、イヌリンの濃度の上昇と共に 450 nm の吸光度は指数的に減少する結果となり、この検量線を用いて糸球体モデルから排泄されたイヌリンの定量を試みた。

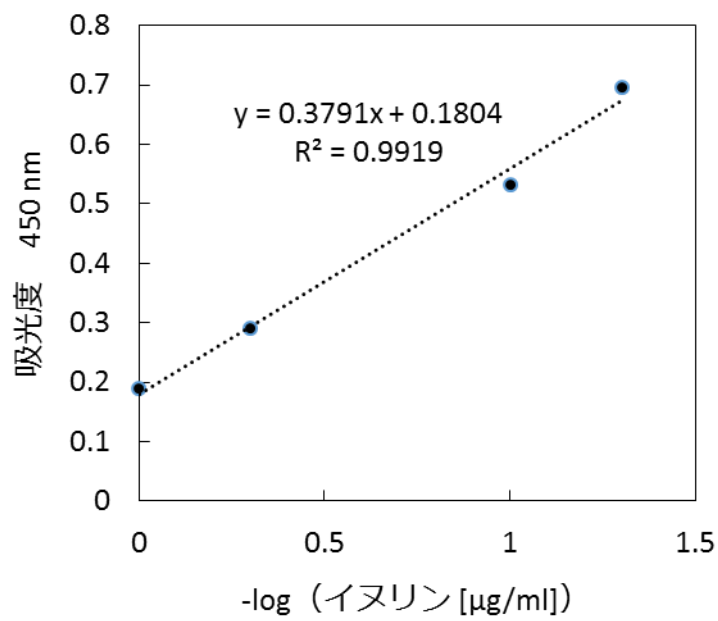


図 4-4 インスリンの検量線

D) チップから排泄されたイヌリンの定量

循環流路内に $1.0 \mu\text{g/mL}$ のイヌリン溶液を満たし、マイクロポンプを循環させながら、透析流路にはシリンジポンプを用いて $50 \mu\text{L/h}$ で PBS を送液した。実験開始から 5、20、30、50 h の時点で透析液を回収し、回収液中のイヌリンの濃度変化を測定した。結果を図 4-5 に示す。

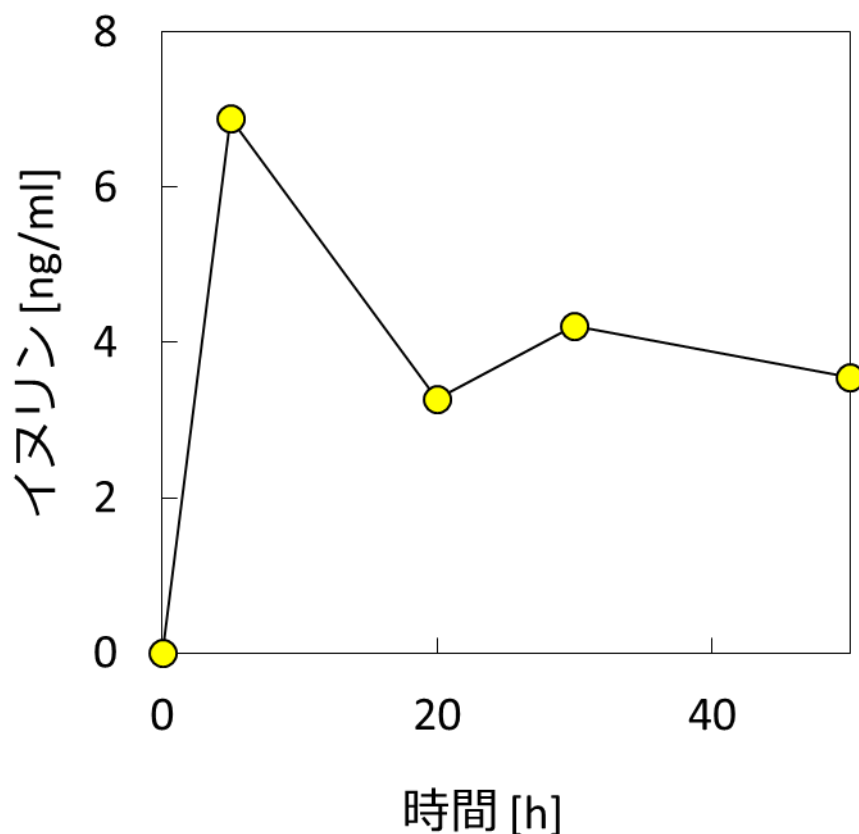


図 4-5 排泄されたイヌリンの時間変化

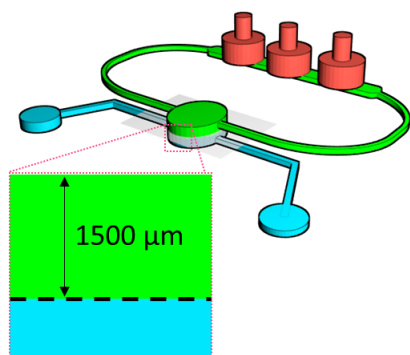
排泄されたイヌリンは初めに 7 ng/mL 程検出されて徐々に濃度が減少する結果となった。実験開始時に循環流路に含まれていたイヌリンは 16 mg であり、結果から見積もられた本実験でのイヌリンの総排泄量は 10 mg であることから、 50 h で 60% のイヌリンが排泄されたものと考えられる。この値は体内からの排泄速度に比べて大幅に遅く、より大きな排泄速度が得られるようにチップを改良する必要があると結論した。

4-2 透析部の再設計

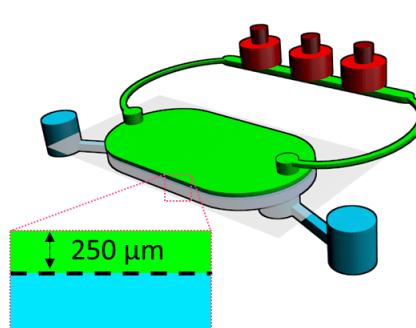
A) 設計方針

より大きな排泄速度を得るため、循環流路の体積を小さくし、膜面積を大きくする設計を行った。以前の設計では透析部の高さが $1500\ \mu\text{m}$ に対して膜面積が $7\ \text{mm}^2$ であり、循環流路体積に対する膜の面積が少なかった。そこで、透析部の高さを $250\ \mu\text{m}$ にして膜面積を $64\ \text{mm}^2$ にすることで、循環流路体積に対する膜面積の割合を9倍にするチップの作製を試みた。図4-6に設計前後のチップの模式図及び膜面積と流路体積を示した。

従来の設計



透析部を拡大した設計



膜面積	: 7 mm ²	→	64 mm ²
透析部の高さ	: 1500 μm	→	250 μm
循環流路体積	: 21.4 μL	→	22.9 μL
膜面積/流路体積	: 0.3	→	2.8

図4-6 チップの設計方針の模式図

B) 透析部を拡大したチップの作製と問題点

作製したチップの写真を図 4-7 に示す。4-1 でイヌリンの定量に用いたモデルと比較して膜面積を大きくしたチップを作製できたが、チップに溶液を導入すると透析膜が膨潤してたわみ、溶液を均一に満たすことができなかった。水に浸す前後の透析膜の写真を図 4-8 に示す。透析膜は水に浸すと面積が 1 割ほど増えるが、透析部の面積を大きくするとその影響が大きくなり、膜のたわみによって流路を塞いでしまう。このため、透析膜のたわみを軽減する膜の挟み込み及び流路形状を検討することとした。

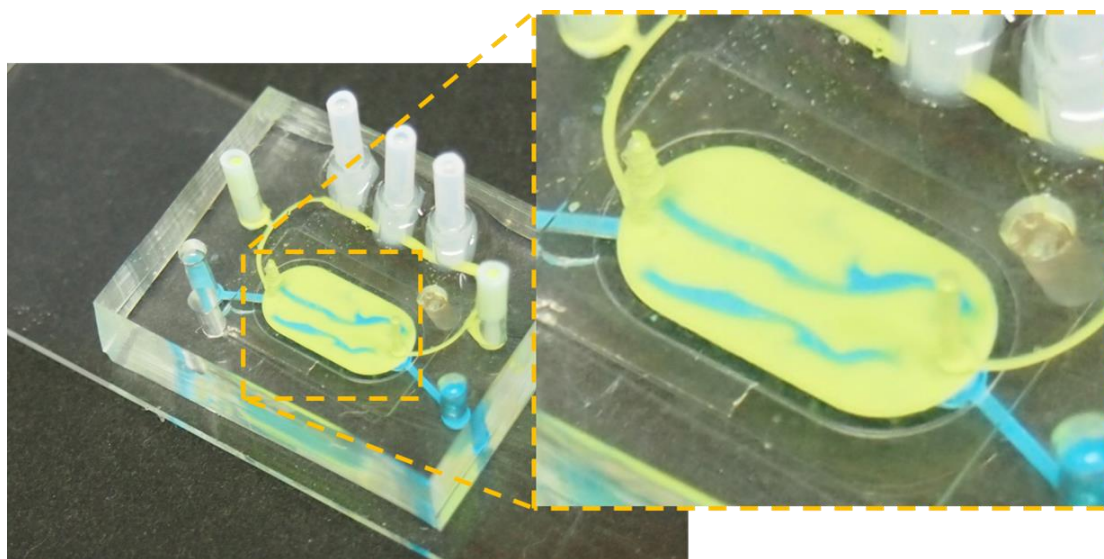
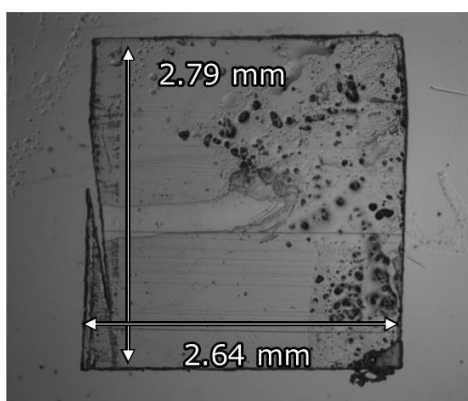


図 4-7 透析部を拡大したチップと透析膜のたわみ

乾燥時



水に浸漬させた時

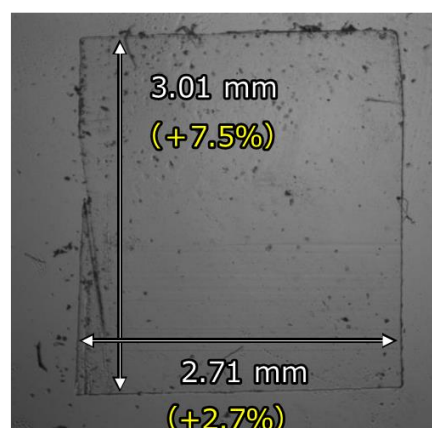


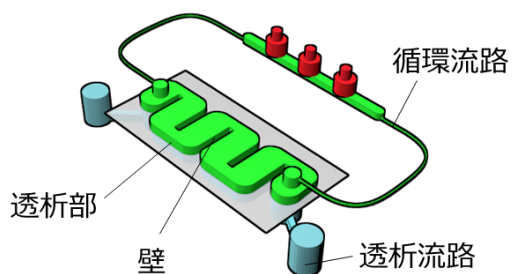
図 4-8 乾燥時と水に浸漬した時の透析膜の比較

4-3 蛇行モデルの開発

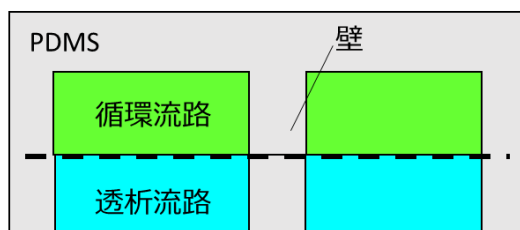
A) 設計

膜のたわみによって流路が潰れる事を防ぐため、大きい透析膜を支える構造が必要であると考え、透析部の流路構造を蛇行させた形状に変更した。膜の挟み込み及び透析部の流路構造を変更したチップの模式図及び設計したフォトマスクを図 4-9 に示す。蛇行モデルの循環流路の流路体積は $80 \mu\text{L}$ 、透析部の膜面積は 77 mm^2 になるように設計した。

蛇行モデルの模式図



透析部の断面図



広い面積の透析膜を壁で支える

フォトマスク

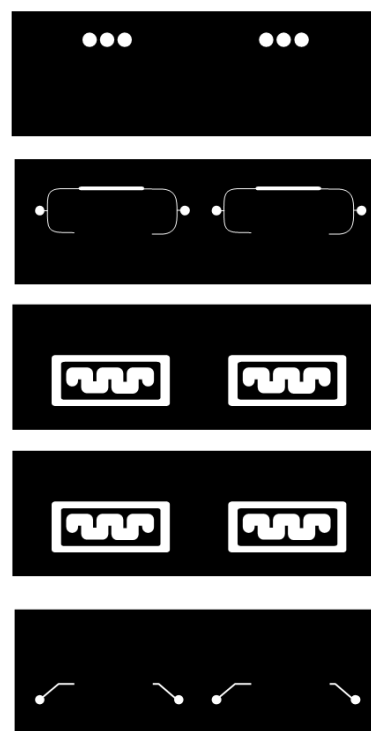


図 4-9 蛇行モデルの模式図とフォトマスク

B) 膜の挟み込み方法の変更

これまでマイクロ糸球体モデルの作製において、乾燥した状態の透析膜と2枚のPDMSシートをプラズマ接着させて透析部を作製していた。これは、膨潤させた透析膜をPDMSシートに挟み込むと水滴の影響で、PDMSシートの接着が不可能になる事が理由である。しかし、液漏れ防止を用いた方法では、濡れたPDMSシートを挟み込んでも水が液漏れ防止流路内に留まるため、膨潤させた透析膜を挟み込むことが可能になると考えた。これによりたわみを軽減させることが可能だと考え、濡れたまま透析膜を挟み込む方法でチップの作製を試みた。比較のため、2つの方法で作製したチップに蛍光ビーズの懸濁液を導入し、マイクロポンプで溶液の循環を確認した。乾燥状態の透析膜を挟み込んだものと比較して、膨潤させた透析膜を挟み込んで作製したチップの透析部はたわみが少なく、溶液が均一に循環していることが確認された。

また、流路外と上下の流路間で液漏れが起きていないかを確認するため、FITC-アルブミンを含む蛍光ビーズの懸濁液上流路に添加し、液漏れ防止流路周辺を観察した蛍光写真を図4-10に示す。蛍光ビーズ及びアルブミンは流路内に留まっており、透析膜を濡れたまま挟み込んでも液漏れが生じないことが確認されたため、透析膜のたわみを軽減した膜の挟み込みが行えたと結論した。

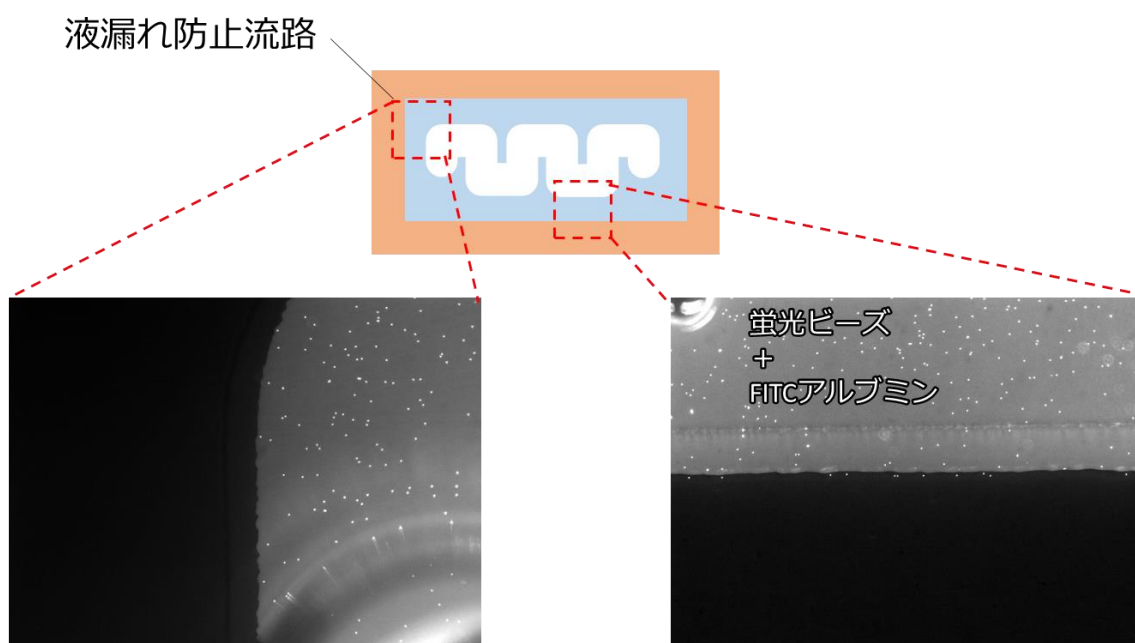


図4-10 流路境界付近の蛍光写真

C) 蛇行モデルでの透析実験

開発した蛇行流路の透析部での低分子化合物の排泄速度を評価するために、100 μM フルオレセインを循環流路に満たし、マイクロポンプで循環させながら、培地を透析流路にシリンジポンプで送液して透析実験を行った。蛍光顕微鏡で循環流路内の濃度変化を経時的に測定した結果を図 4-11 に示す。

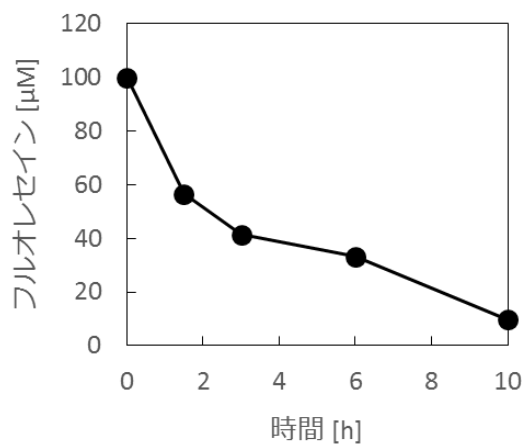


図 4-11 蛇行モデルでのフルオレセインの濃度変化

循環流路内のフルオレセイン濃度は徐々に減少していき、10 時間後にはほとんど排泄された。得られた排泄速度は人体内でのイヌリンの腎排泄速度に近いものと考えられる。この排泄速度を 3 章の集積化モデルと比較するため、消失速度定数の算出を試みることにした。

D) 消失速度定数の解析

フルオレセインの消失速度定数を算出するため、集積化モデル（流路体積 80 μL 、膜面積 9 mm^2 ）及び蛇行モデル（流路体積 80 μL 、膜面積 77 mm^2 ）の循環流路中のフルオレセイン濃度の対数を取り、時間に対してプロットした（図 4-12）。

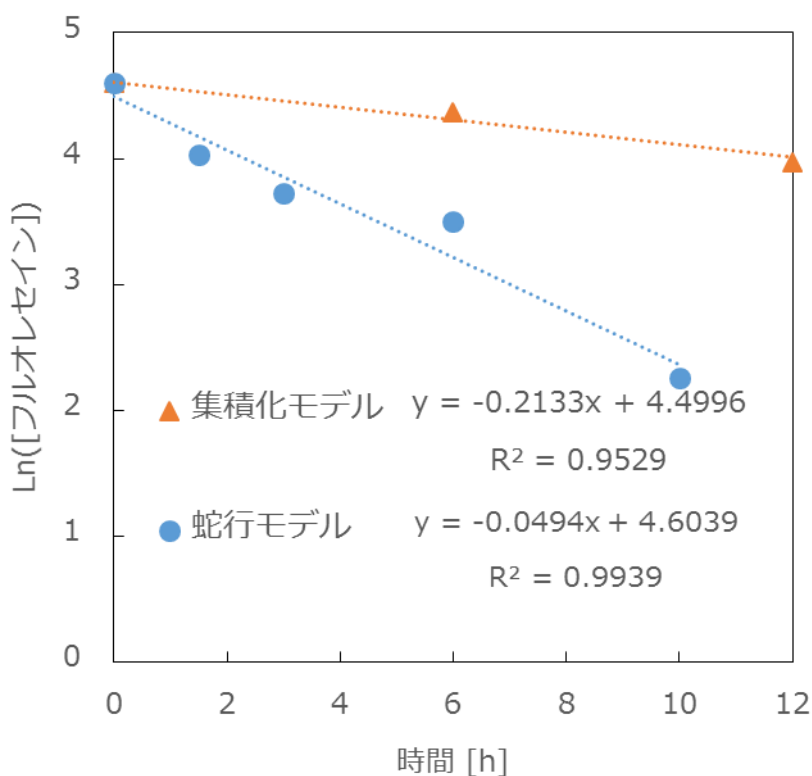


図 4-12 集積化モデルと蛇行モデルでの消失速度定数の比較

傾きより、集積化モデルでの消失速度定数は 0.05、蛇行流路では 0.21 と見積もられた。非結合型低分子薬剤のチオテパの人体での消失速度定数は 0.15~0.42 であるのに対して、蛇行モデルでは腎排泄を受ける薬剤と同様の値を示し、人体の排泄速度に近づけることができたと結論した。

4-4 結論

本章ではマイクロ糸球体モデルでの排泄速度を臨床データと比較するため、チップから排泄されたイヌリンの定量及び排泄速度を人体に近づけるための流路設計の検討を行った。透析部の面積を広くするための流路構造やチップの作製法を検討することで、従来のモデルよりも排泄速度が速い蛇行モデルの開発に成功した。このモデルでのフルオレセインの透析実験では、集積化モデルよりも体内の非結合型薬剤の排泄速度に近づけることに成功した。

5 章 尿細管の機能を追加したマイクロ腎排泄モデルの開発

5-1 序論

薬剤は、腎臓において糸球体で限外濾過、尿細管で分泌・再吸収を受けて排泄される。このような腎臓の複数の過程を経た排泄過程は薬剤の残留性に密接に関与しているが、糸球体と尿細管の機能を組み合わせたような *in vitro* の試験系は存在しない。そこで、本章では細胞による尿細管細胞による輸送を模倣した部位の開発を行い、糸球体を模倣した部位と組み合わせることで、今までにない高度な腎排泄モデルの開発を行うことを目的とした。

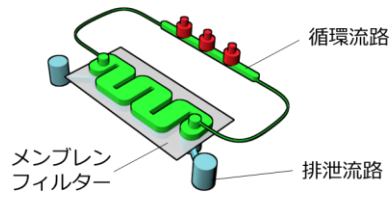
5-2 尿細管の機能を模倣した部位の基礎検討

A) 再吸収モデル、分泌モデルの設計と原理

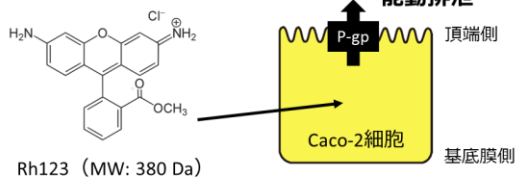
糸球体と尿細管の機能を模倣したマイクロ腎排泄モデル構築の基礎検討として、尿細管の機能を模倣した部位だけのチップを開発することとした。チップの設計及び作製方法は 4-3 に示した蛇行モデルと同様のものを用い、透析膜をメンブレンフィルターに置き換えたものを用いた。細胞として、本来尿細管由来の細胞を用いるべきであるが、物質輸送に関わるトランスポーターが十分に発現した優れた細胞株が存在せず、利用できない。そこで本研究では腸上皮細胞由来の細胞株 Caco-2 細胞をモデル細胞として用いることとした。Caco-2 細胞は尿細管上皮で薬剤の能動排泄に関与するトランスポーター P-gp を発現していることが知られており、モデル細胞としてふさわしいと考えた。また、排泄のモデル化合物としては P-gp によって排泄されることが知られている[63,64]ローダミン 123 (Rh123) を用いることとした。

本研究では、細胞を生体内と同じ向き、すなわちメンブレンフィルターの排泄流路側に培養したものを Rh123 の分泌モデル、生体内と逆向き、すなわちメンブレンフィルターの循環流路側に細胞を培養したものを Rh123 の再吸収モデルとして用いることとした。(図 5-1)。

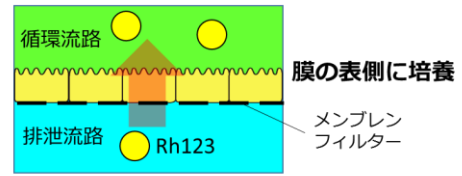
用いたモデルの概略図



Rh123の能動輸送

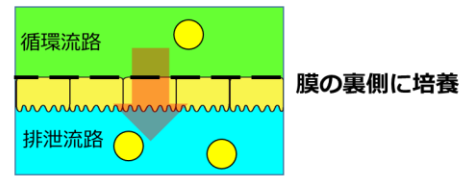


再吸収モデル



透析流路から循環流路への輸送

分泌モデル



循環流路から透析流路への輸送

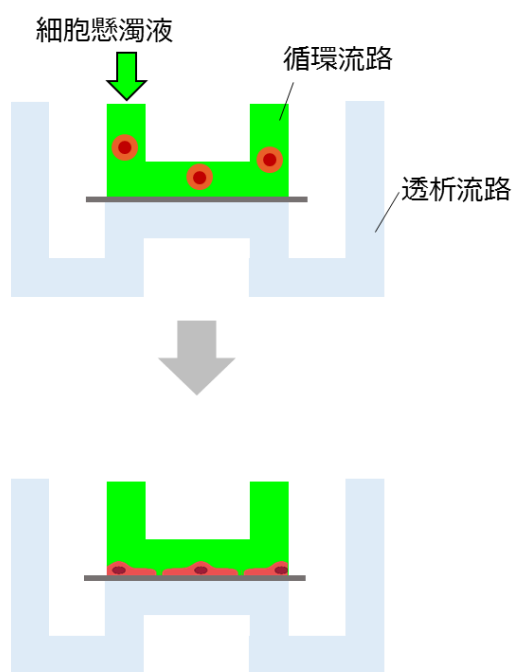
図 5-1 尿細管の機能を模倣したチップの概略図

B) 再吸収モデル、分泌モデルへのモデル細胞の培養

メンブレンフィルターに Caco-2 細胞を播種するため、チップに 70%エタノールを噴霧した後、クリーンベンチ内の紫外線下で一晩滅菌した。細胞の接着や伸展を向上させるため、メンブレンフィルターは 0.3 mg/mL のコラーゲン溶液 (Cellmatrix Type I-C, 新田ゼラチン) を用いて 3 h コラーゲンコートし、 4.5×10^6 cell/mL の Caco-2 細胞の細胞懸濁液を再吸収モデルでは循環流路から導入してメンブレンフィルターの表側に細胞を接着させ、分泌モデルでは透析流路から導入した後にチップを反転させて 3h 静置してメンブレンフィルターの裏側に細胞を接着させた (図 5-2)。

再吸収モデル

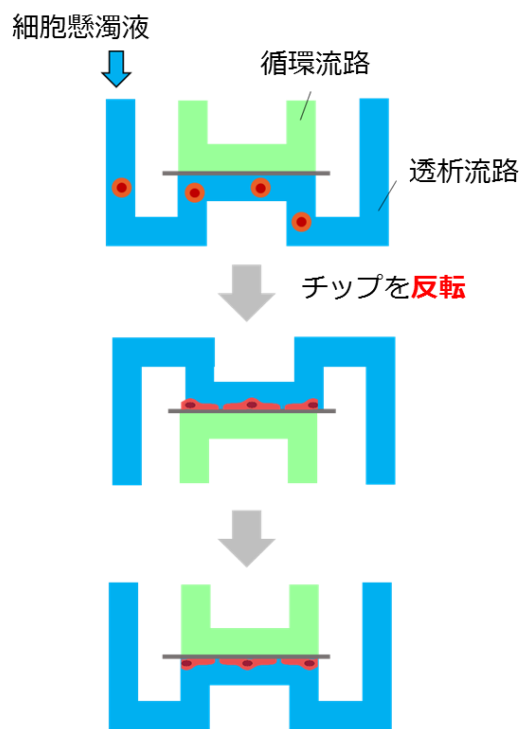
循環流路から細胞懸濁液を導入



細胞を膜の表側に接着

分泌モデル

透析流路から細胞懸濁液を導入



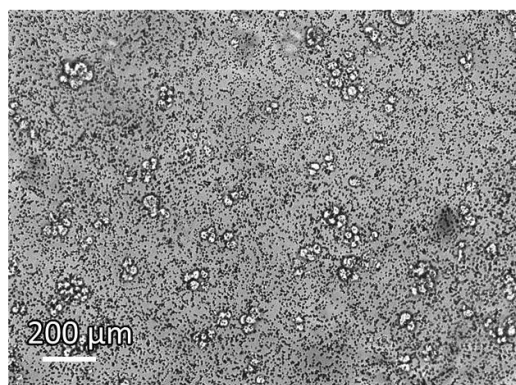
細胞を膜の裏側に接着

図 5-2 再吸収モデル及び分泌モデルへの細胞の播種方法

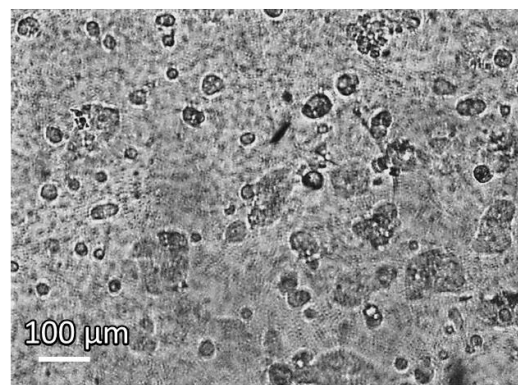
C) チップ内での細胞の長期培養

Caco-2 細胞をメンブレンフィルターに接着させた後、チップの循環流路及び透析流路に 200 μ L ピペットチップで作製したリザーバーを立てて培地を導入し、1 日置きに培地交換をして 14 日間培養した。チップ内に培養した Caco-2 細胞の明視野写真を図 5-3 に示す。チップ内の Caco-2 細胞は、再吸収モデル、分泌モデル共に 5~6 日程度でコンフルエントに達し、10 日前後で密着結合を形成して細胞の境界が鮮明になり、14 日程度で一部柔毛のような立体的な構造を示した。Caco-2 細胞の分化が確認できたため、培養 14 日程度のチップを実験に用いた。

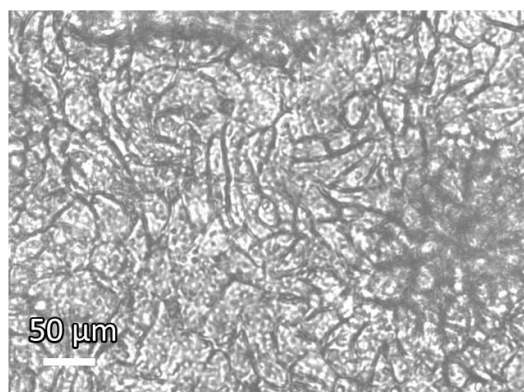
播種直後



12時間後



10日培養



14日培養

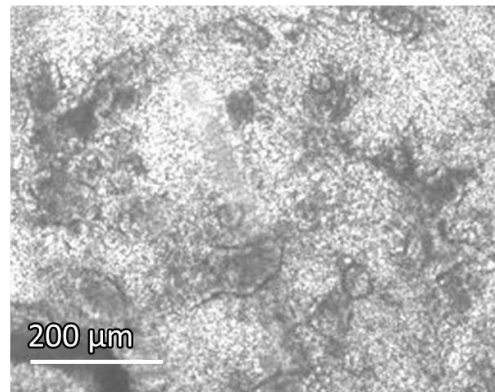


図 5-3 チップ内の Caco-2 の明視野写真

D) Rh123 の能動輸送の確認

100 μM Rh123 を再吸収モデル、分泌モデルの循環流路にそれぞれ導入しマイクロポンプを用いて循環させながら、排泄流路に同濃度の Rh123 をシリンジポンプで送液した。再吸収モデル、分泌モデルの循環流路内の Rh123 の濃度を蛍光顕微鏡で測定した結果を図 5-4 に示す。

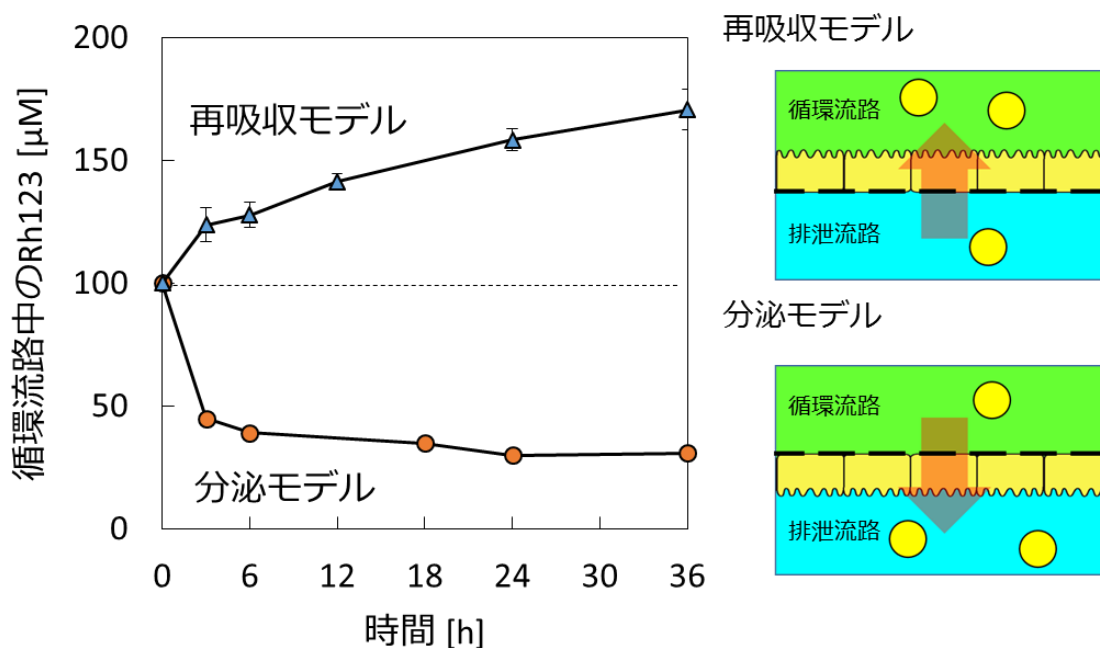


図 5-4 再吸収モデル、分泌モデルでの Rh123 の輸送実験

再吸収モデルでは初濃度の 100 μM から徐々に濃度が増加する一方で、分泌モデルでは初濃度から徐々に減少する結果となった。細胞を介した上下の流路中の Rh123 の初濃度は共に同濃度であるため、受動輸送の影響が少ないと考えられる。また、細胞を培養する方向によって逆向きの輸送が起こっていることから、チップ内でトランスポーターによる能動輸送の測定が行えたと結論した。

この輸送の透過係数 P_{app} を 2-9 で示した方法を用いて解析すると、再吸収モデルでは 1.1×10^{-6} 、分泌モデルでは 5.4×10^{-6} となった。この結果は、Rh123 の Caco-2 細胞による能動輸送の透過係数の文献値は $10^{-6} \sim 10^{-5}$ と一致している[65]。このため、尿細管のトランスポーターによる輸送を模倣した再吸収モデル、分泌モデルの基礎検討及び開発に成功したと結論した。

P-gp による輸送は近位尿細管の腎分泌の過程に関与している事や、腎排泄を受ける薬剤は再吸収よりも分泌の影響を受けやすい事[30]から、本研究では糸球体の限外濾過と尿細管の分泌を組み合わせたマイクロ腎排泄モデルの開発を試みることにした。

5-3 マイクロ腎排泄モデルの開発

A) マイクロ腎排泄モデルの概略

循環器系からの腎臓での糸球体濾過と尿細管における P-gp による能動分泌を模倣するために、従来の透析部に加えて、P-gp を発現させた Caco-2 細胞をメンブレンフィルターの裏側に培養した分泌部を持つマイクロ腎排泄モデルを設計した。マイクロポンプによって循環流路内の溶液を循環させると、低分子化合物は透析部の透析膜によって排泄流路へと排泄される。また、P-gp の基質となる物質は、分泌部で基底膜側から頂端側への能動分泌を受けて排泄される (図 5-5)。

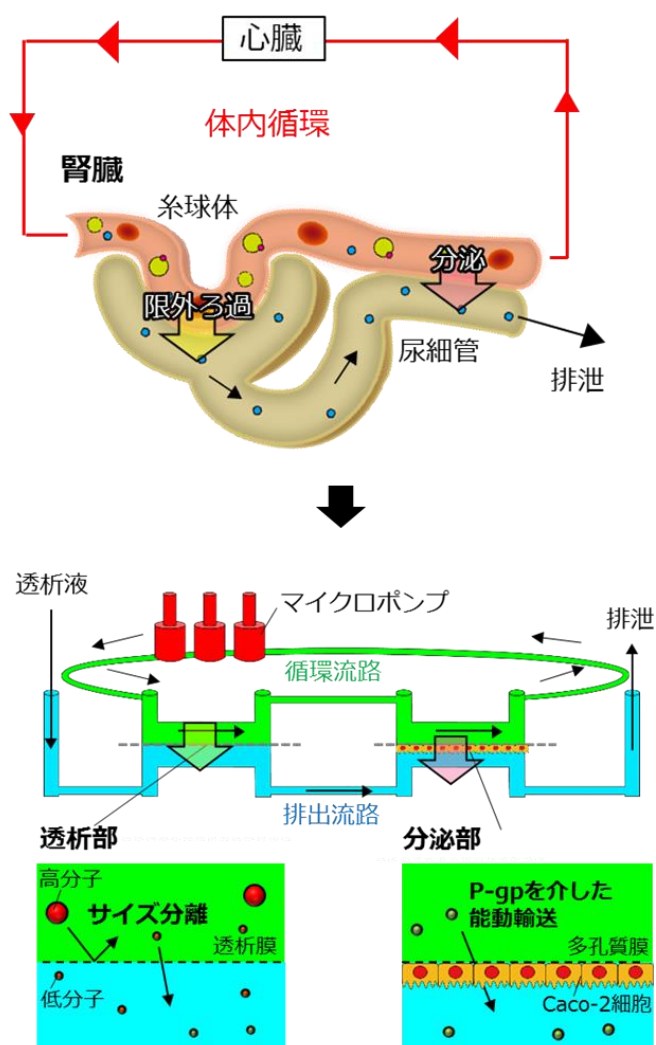


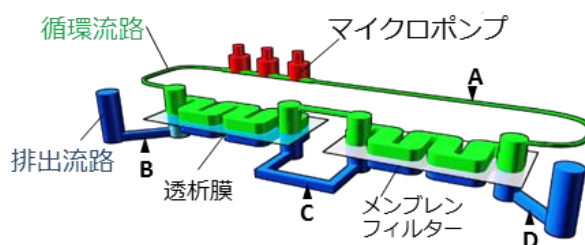
図 5-5 マイクロ腎排泄モデルの概略図

B) マイクロ腎排泄モデルの設計

マイクロ腎排泄モデルの立体的模式図を図 5-6-a に示す。このモデルは透析膜とメンブレンフィルターの2枚の膜によって、循環流路と排泄流路が仕切られている。排泄速度を上げるため、透析部と分泌部の膜面積を広げ、さらに膜のたわみを軽減するために流路を蛇行させた構造に設計を採用した。透析部、分泌部はそれぞれ膜面積 77 mm^2 、流路高 $300 \mu\text{m}$ 、循環流路は幅 $250 \mu\text{m}$ 、高さ $125 \mu\text{m}$ で、排泄流路は幅 $800 \mu\text{m}$ 、高さ $500 \mu\text{m}$ に設計した。マイクロポンプは循環流路の真上に直径 3.0 mm の制御ポートが3つ配置されており、空気圧によって循環流路を真上から位相を変えて押しつぶす事で溶液を循環させた。流路高や流路幅から、透析部、分泌部を含めた循環流路の体積は $90 \mu\text{L}$ と見積もられる。循環流路内の濃度変化は蛍光顕微鏡によって検出点 A で測定し、排泄流路内の濃度変化は透析部前、透析部通過後、分泌部通過後それぞれの濃度を検出点 B、C、D で測定した。

濾過+分泌モデルの詳細な上面図を図 5-6-b に示す。溶液を循環流路に導入するため、循環流路両脇に直径 2.0 mm の導入孔と排泄孔を設けた。また、分泌部のメンブレンフィルターの裏にモデル細胞を培養するため、排泄流路に細胞導入孔と細胞排泄孔を設けた。

(a)



(b)

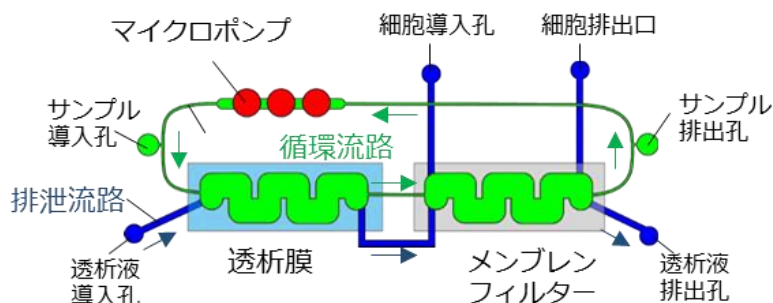


図 5-6 マイクロ腎排泄モデルの立体図(a)と上面図(b)

C) マイクロ腎排泄モデルの作製

目的の設計のマイクロチップを作製するために用いたフォトマスクを図 5-7a に示す。マイクロポンプ、排泄流路の鋳型は重量制御法を用いて作製した。SU-8 3025 をスライドガラスに塗布し、20 min 加熱後、レジストの上からフォトマスクを被せて流路部分を紫外線で 10 min 露光して硬化させた。その後、乳酸エチルを用いて未固化部分を洗浄し、目的の流路高の鋳型を作製した。循環流路の鋳型はマイクロポンプで流路の端を押し潰しやすくするため、裏面照射法を用いて断面が半円状の鋳型を作製した。

マイクロチップは流路造形した 3 枚の PDMS シートに透析膜とメンブレンフィルターを挟み込み、それぞれの PDMS シートとスライドガラスをプラズマ処理して接着させて作製した。上部 PDMS シートは長さ 60 mm、幅 26 mm、高さ 4 mm のアクリル製の型を用いて、中部・下部 PDMS シートは 2 枚の鋳型を向かい合わせにして長さ 60 mm、幅 26 mm、高さ 1.5 mm の枠を用いて鋳造した (図 5-7-b)。

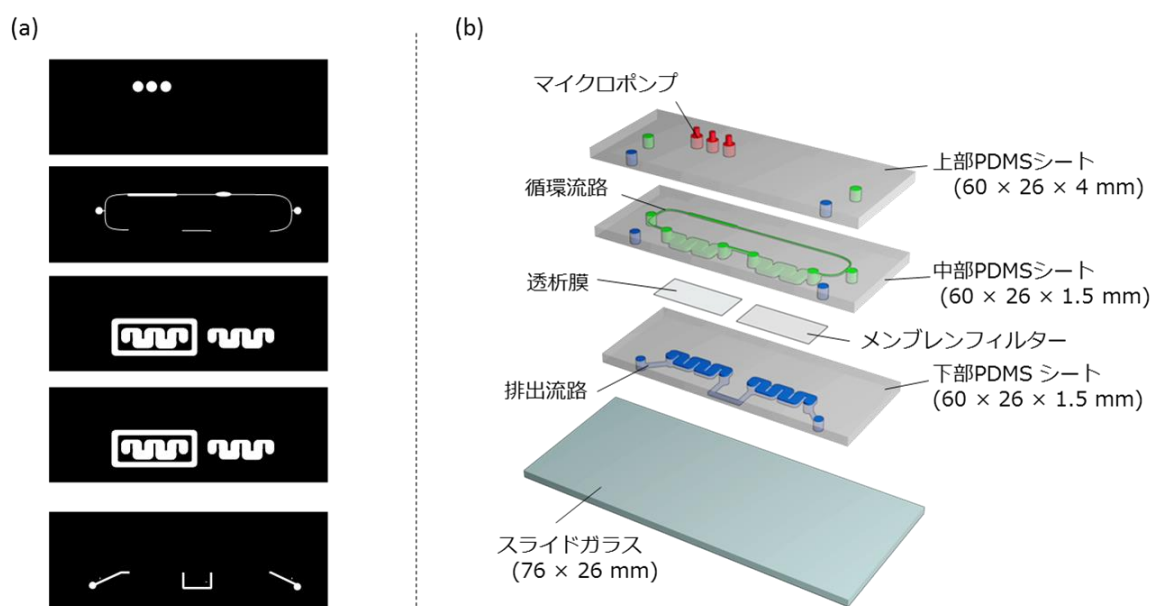


図 5-7 濾過＋分泌モデルのフォトマスク(a)及び作製(b)

上部 PDMS シートにマイクロポンプを作製するため、長さ 0.5 mm のシリコンチューブで覆った長さ 1.5 mm のテフロンチューブ(内径 1.0 mm、外径 2.0 mm)をマイクロポンプの鋳型の上に PDMS プレポリマーを用いて加熱して接着させ、その後アクリルの枠に PDMS プレポリマーを流し込んで 90°C のオーブンで 15 min 加熱し、マイクロポンプの制御用流路が内蔵された上部 PDMS シートを得た。マイクロポンプの薄膜を作製するため、アクリル板上にスピコート (1250 rpm、60 s) して形成した PDMS プレポリマーの薄膜を 90°C、5 min で加熱した。作製した PDMS 薄膜を酸素プラズマ処理して上部 PDMS シートと接着してマイクロポンプが内蔵された上部 PDMS シートを作製した。

各種導入孔は 2 mm の生検トレパンを用いて作製した。透析膜からの液漏れを防止するため、3-4 で開発した液漏れ防止流路を透析部の周りに作製し、PDMS シートを貼り合わせた後に SU-8 を流し込んで透析膜を接着した。作製したマイクロチップの写真及び実験系の概略図を図 5-8- に示す。

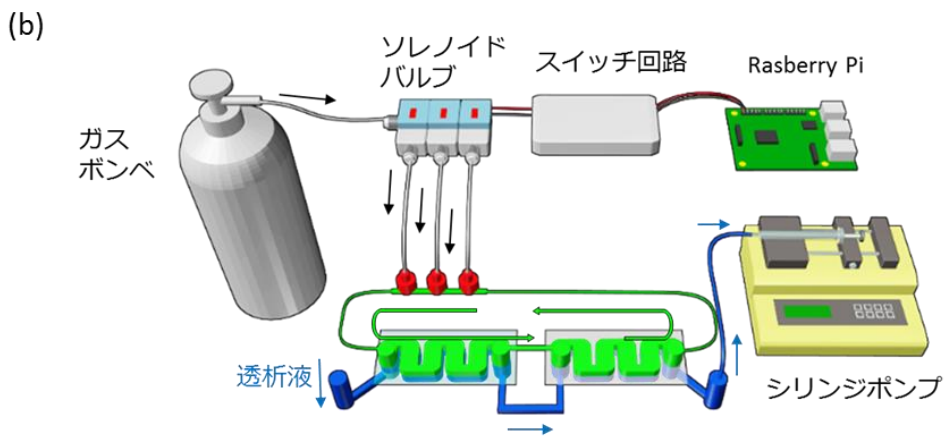
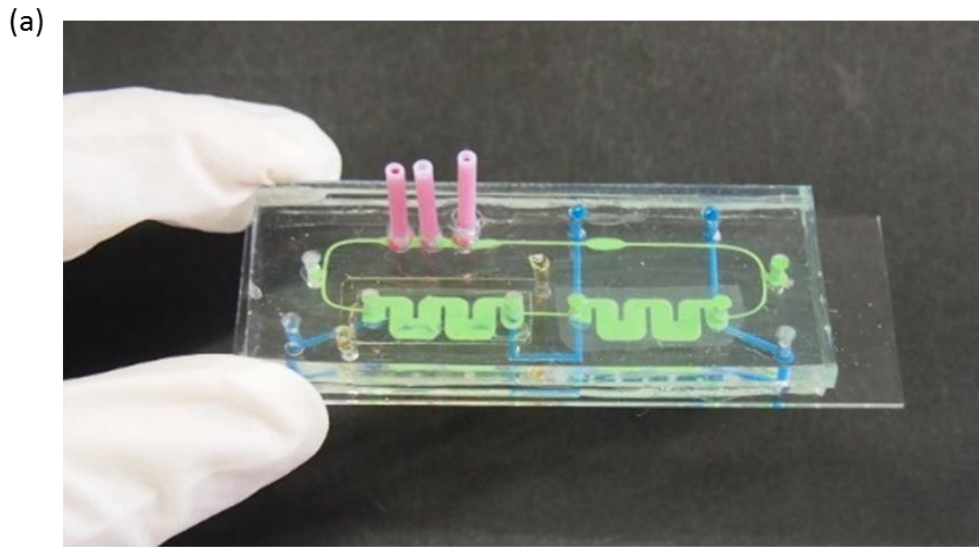


図 5-8 作製したチップの写真(a)と実験系(b)

D) 細胞なしでの透析実験

透析部位と分泌部位を組み合わせたマイクロ腎排泄モデルにおいて、まず透析部位が正しく機能しているか確認することを試みた。分泌部位において物質を移動させないために、メンブレンフィルターの代わりに PDMS 薄膜を設置したモデルを作製した (図 5-9-a)。PDMS 薄膜は PDMS プレポリマーを 1250 rpm、60 s の条件でスピコートし、加熱硬化したものを用いた。低分子化合物として親水性で P-gp の基質では無いカルセイン (MW : 623) と [66]、P-gp の基質で基底膜側から頂端側に輸送される事が知られている Rh123 を、高分子化合物としてはテトラメチルローダミン (TMR) デキストラン (MW : 65-85 kDa) 用いた。循環流路内に 150 μM カルセインと 50 μM TMR デキストランの混合溶液もしくは 50 μM Rh123 と 50 μM TMR デキストランの混合溶液をそれぞれ循環させ、排泄流路にはシリンジポンプを用いて培地を 200 $\mu\text{L}/\text{h}$ で導入した。低分子のカルセインと Rh123、高分子の TMR デキストランは、蛍光顕微鏡のフィルタを変えて測定することで、濃度変化を同時に測定できる。

検出点 A で測定した循環流路内の濃度変化を図 5-9-b に示す。カルセインと Rh123 の濃度は徐々に減少する一方で、TMR デキストランの濃度は一定であった。一方検出点 B、C、D で測定した排泄流路内のカルセイン、及び Rh123 の濃度変化を図 5-9(c,d)に示す。それぞれ検出点 B ではほとんど検出されず、透析部通過後と分泌部通過後の検出点 C と D において同濃度で検出された。検出される濃度は徐々に減少したが、これは循環流路中の濃度が減少した事で、循環流路と排泄流路の濃度差が小さくなったためであると考えられる。

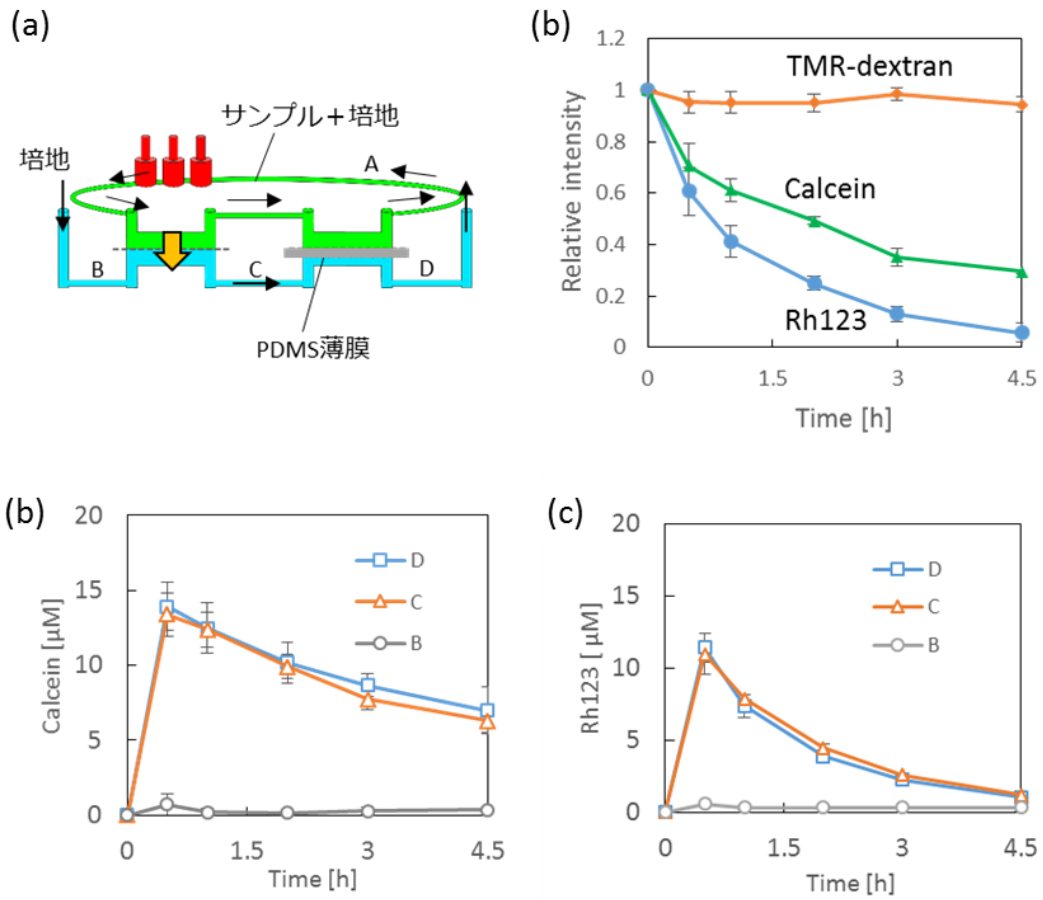


図 5-9 細胞無しモデルの概略図(a)及び透析実験における循環流路中(b)と排泄流路中(c)、(d)の濃度変化 (n=3)

E) 分泌部での細胞培養

マイクロ腎排泄モデル分泌部のメンブレンフィルター裏面に 5-1(B)に記した手順で Caco-2 細胞を播種した。排泄流路の検出点に細胞が接着すると、測定に影響が出ることが予想されたため、排泄流路の導入孔と排泄孔を 2.0 mm のテフロン丸棒で塞ぐ事で、検出点に細胞懸濁液を侵入させる事なく懸濁液の導入が行えた。細胞導入孔と排泄孔をテフロン丸棒で塞いだ後、チップを反転して 3h 静置する事で膜の裏側に細胞を接着させた (図 5-10)。

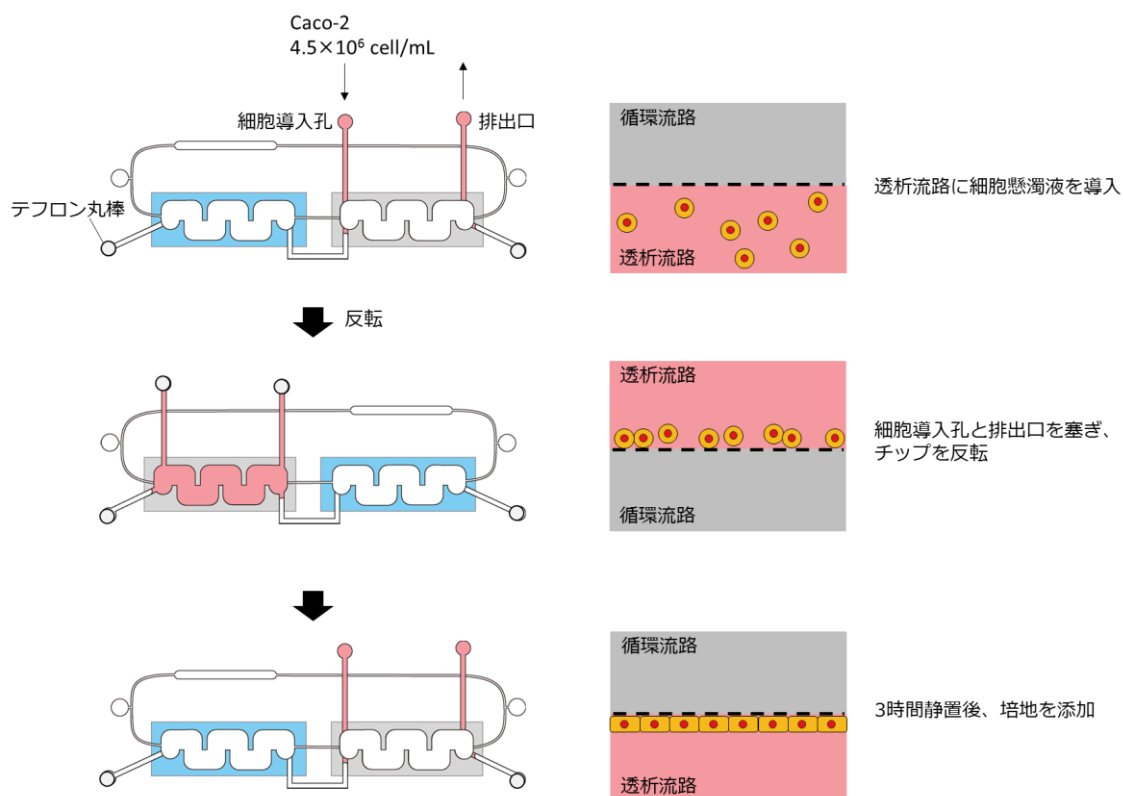


図 5-10 分泌部への細胞の播種方法

膜の裏に Caco-2 細胞を接着させた後、細胞導入孔と排泄孔にピペットチップをリザーバーとして挿入し、ここから培地を流すことにより接着していない細胞を洗浄した。培地は1日おきに交換し、インキュベーター内で18日間静置培養した。細胞密度と生存性を確認するため、18日培養後の Caco-2 に Live/Dead 染色を行った。流路全域に生細胞が培養されている事と、死細胞が少ない培養が行えた事を確認した (図 5-11)。

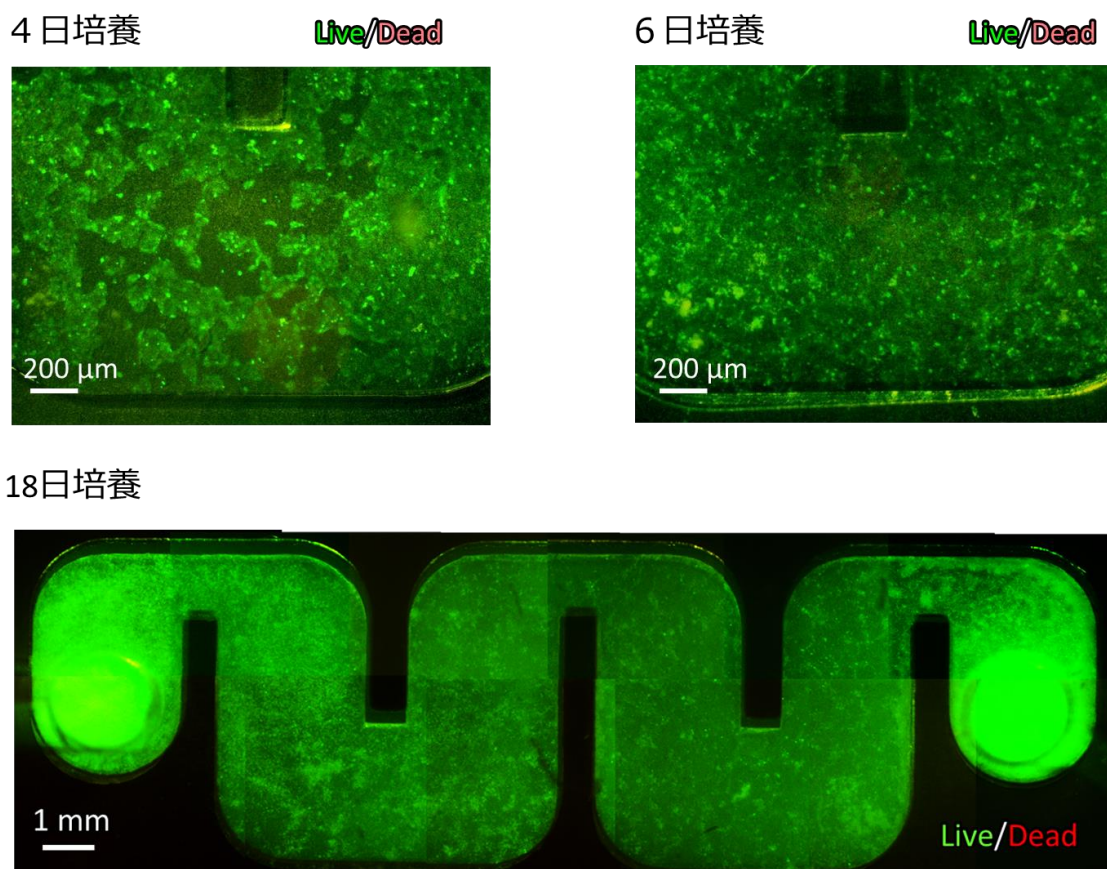


図 5-11 分泌部で培養された細胞の Live/Dead 染色の蛍光写真

また、培養した細胞を明瞭に観察するために、ローダミンファロイジンを用いて細胞骨格を染色して蛍光観察したところ、細胞が流路全体に隙間なく伸展していることを確認した（図 5-12）。

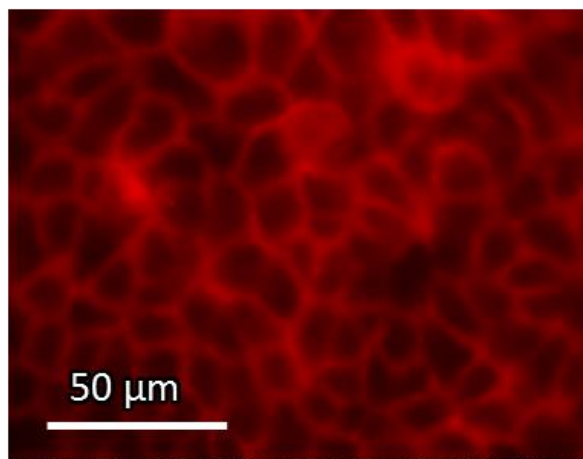


図 5-12 分泌部に培養した Caco-2 細胞の細胞骨格染色写真

F) マイクロ腎排泄モデルでの排泄実験（透析＋分泌実験）

Caco-2 細胞を 18 日培養したマイクロ腎排泄モデルで透析実験を行った。模式図を図 5-13(a)に示す。150 μM カルセインと 50 μM TMR-デキストランの混合溶液もしくは、50 μM Rh123 と 50 μM TMR-デキストランをそれぞれ循環流路内で循環させ、シリンジポンプを用いて排泄流路に培地を 200 $\mu\text{L/h}$ で導入した。検出点 A で測定した循環流路内の濃度変化を図 5-14-b に示す。細胞なしのモデルと同様に高分子の TMR デキストランはほとんど減少せず、低分子のカルセインと Rh123 は徐々に減少する結果となり、これは分泌部の Caco-2 細胞が密着結合を形成して高分子が循環流路に保持された事を示している。

検出点 B、C、D で測定した排泄流路の濃度変化を図 5-13-c,d に示す。カルセインは細胞なしの系と同様に検出点 B で検出されず、C と D で同じ濃度で検出され、この結果はカルセインが P-gp で輸送されないという知見と事と一致している。一方、Rh123 は透析部通過後の検出点 C よりも分泌部通過後の検出点 D の方が高い濃度で検出された。これは分泌部で Rh123 が細胞によって輸送された事を示しており、Rh123 が P-gp によって選択的に輸送されたためと考えられる。

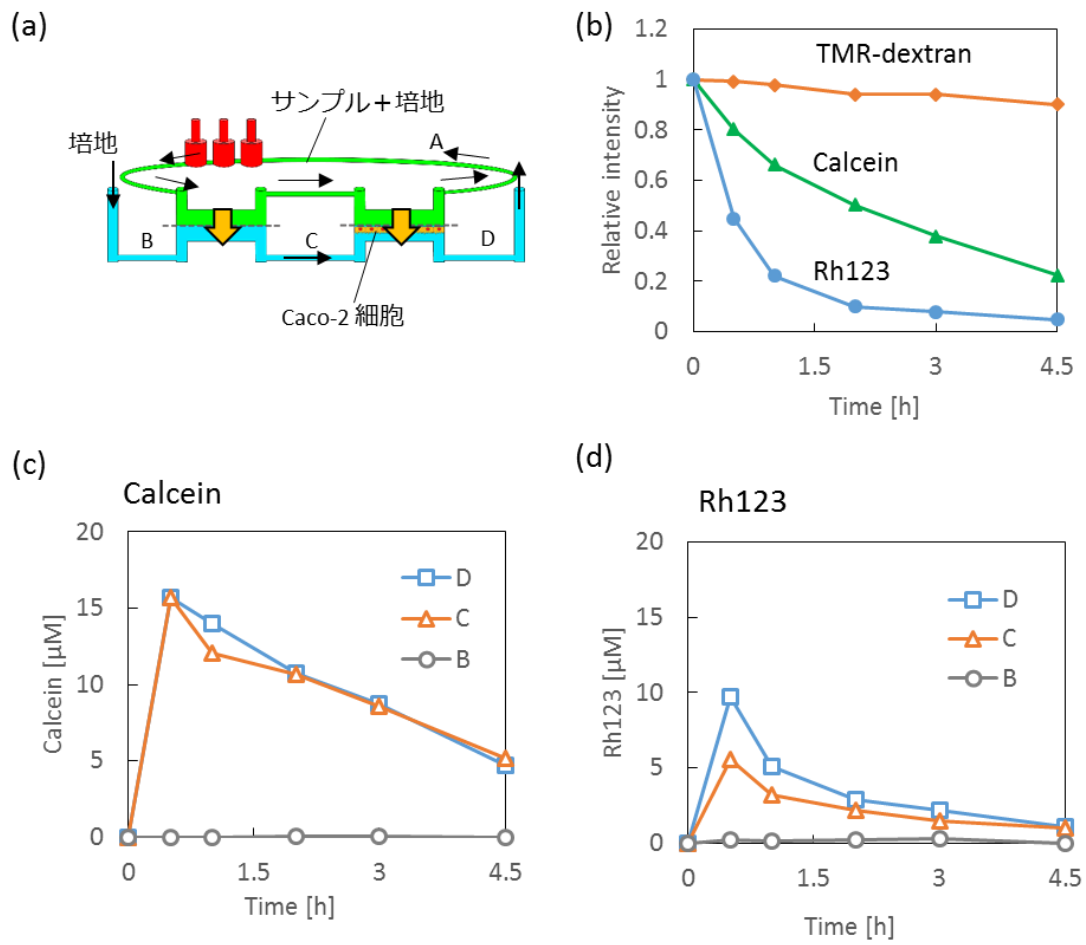


図 5-13 マイクロ腎排泄モデルの概略図(a)及び透析実験における循環流路中(b)と排泄流路中(c)、(d)の濃度変化

この結果が P-gp の輸送によるものなのかを確認するため、Caco-2 を 18 日培養したチップの排泄流路に P-gp の阻害剤として知られているキニジン[67,68]を 3 時間作用させて同様の実験を行った。50 μM キニジン、50 μM Rh123、50 μM TMR デキストランを循環流路で循環させ、排泄流路に培地を 200 $\mu\text{L}/\text{h}$ で導入した時の排泄流路中の濃度変化を図 5-14-a,b に示す。Rh123 は C と D においてほぼ同濃度で検出された。この事から Rh123 の輸送が P-gp によるものと結論した。

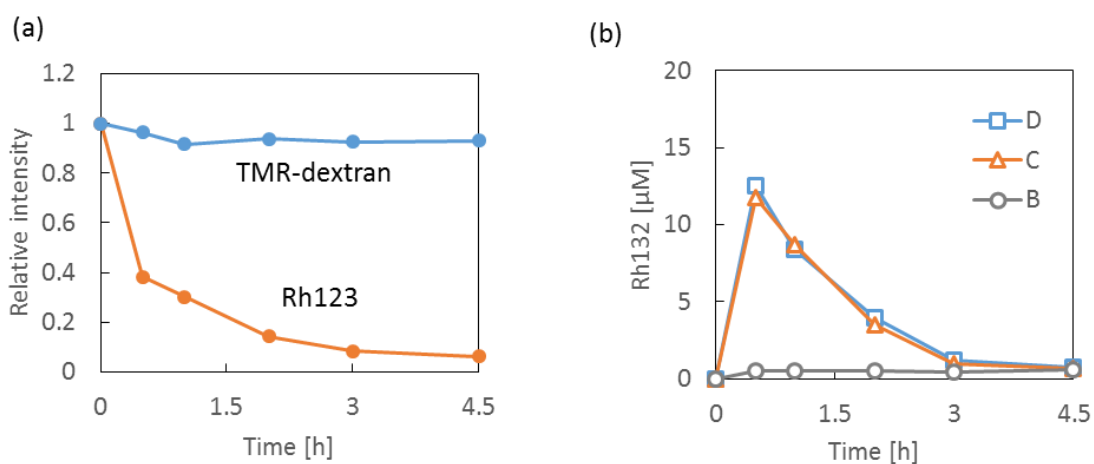


図 5-14 阻害剤を作用させた透析＋分泌実験における循環流路中(a)と排泄流路中(b)の Rh123 の濃度変化

Rh123 の排泄実験について、検出点 C と D で検出された濃度比を透析実験、透析+分泌実験で比較した結果を図 5-15 に示す。細胞を含まない透析実験では、D/C は 1 程度であり、検出点 C と D の間で Rh123 の輸送されなかった事を示している。一方で、細胞を含んだ透析+分泌実験での D/C は 1.5 程度であり透析実験と比較して高い値になった。これは、P-gp によって Rh123 が分泌される知見に一致している。また、阻害剤を含んだ透析+分泌実験の D/C の値は 1 程度であり、阻害剤の有無で有意差が得られた。

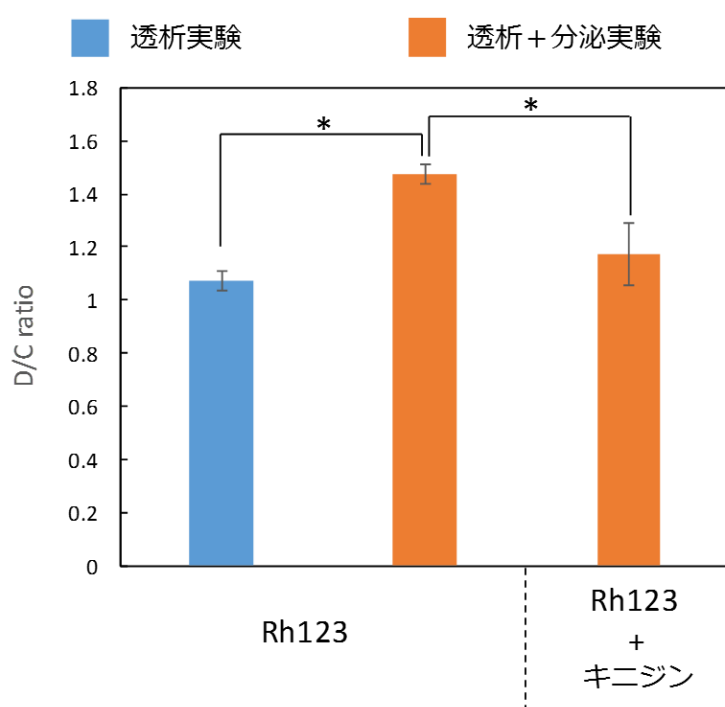


図 5-15 各実験における検出点で検出された Rh123 の濃度比(* $P < 0.05$, $n = 3$)

5-4 結論

本章では、尿細管を模倣した部位の開発及び、糸球体の濾過機能と尿細管の分泌機能を模倣した部位を組み込んだマイクロ腎排泄モデルの開発を試みた。尿細管を模倣した部位の開発では、膜の表側もしくは裏側に細胞を培養し、トランスポーターによる能動輸送をチップ内で測定することに成功した。透析＋分泌実験では、P-gp の基質である Rh123 が分泌部で選択的に排泄され、糸球体濾過と尿細管分泌の2つの腎排泄の過程を模倣したモデルの概念実証を実現した。このようなモデルは、将来的に分泌クリアランスの評価や、腎排泄を模倣した高度なバイオアッセイに応用できると考えられる。

今回の透析＋分泌実験では、排泄流路の分泌部通過後において P-gp の基質のみが濃度上昇が確認され、基質選択的な排泄を確認できた一方で、循環流路中での排泄速度には大きな差は見られなかった。これは、透析部での排泄速度が分泌部に比べて非常に大きいため、分泌の影響があまり見られなかった事が原因だと考えられる。今後、透析部と分泌部の面積比などを検討し、臨床での値に近づけていくことが必要であると考えられる。また、今回の実験ではモデル細胞として P-gp の発現が良好な Caco-2 細胞を用いたが、尿細管由来の細胞を用いていない事が問題点として挙げられる。そのため、尿細管の輸送に関与するトランスポーターを安定的に発現した尿細管由来の細胞が開発される必要があるだろう。

6章 総合考察

新薬開発の開発においては、膨大な数の薬剤の候補化合物の中から薬効が高く副作用が少ない薬を選定するため、莫大な時間と費用をかけて細胞試験、動物実験、臨床試験を試験が行われており、その効率化が求められている。しかしながら、細胞試験や動物実験の段階で良い結果を示したものが、臨床試験の段階で人体内での薬物動態が悪くドロップアウトする例が後を絶たない。また、現在このような薬物動態の試験の主流となっている動物実験は世界各国で削減傾向にあるため、現在の細胞実験のレベルで薬剤の体内での挙動を調べる事ができる高度な細胞実験のニーズが高まっている。マイクロチップを用いた細胞実験は、細胞を体内の微小環境に近い状態で培養することや流体操作によって高機能な細胞実験を行うことが可能であり、近年医療や薬学の分野でも注目され始めてきた。そのような中で、薬物動態の吸収・分布・代謝・排泄の過程を一枚のチップに集積化する事を目指した研究も行われおり、著者は薬物が腎臓で排泄される過程に着目し、薬剤の腎排泄の過程をチップに再現することができれば、副作用や薬剤の残留性を評価できる高度な細胞実験を行うことができるのではないかと考えた。

本研究ではマイクロチップを用いて薬剤の腎排泄を再現するシステムを構築するために必要な要素として、薬剤の体内循環をチップ内で模倣するための循環流路及びマイクロポンプ、チップから薬剤を排泄させる腎臓の糸球体及び尿細管を模倣した部位、薬剤の標的となる細胞を培養する部位が必要である。Imuraらは循環流路、マイクロポンプ、糸球体を模倣した透析部位を持つマイクロ糸球体モデルを開発し、モデル内で抗がん剤のアッセイを行った。しかし、このモデルでは尿細管の再吸収や分泌の模倣が行えていない事や、アッセイの操作が煩雑であり、効率や再現性が悪いなど問題点があった。そこで、本研究では初めに糸球体の機能を模倣した糸球体モデルの改良及び効率化を目指して研究を行った。

糸球体モデルの改良及び効率化を目指し、本研究では1つのマイクロポンプで3組のユニットの循環流路を並列に循環させる設計を行った。このような設計を実現するために、透析部に用いている透析膜を隣接して挟み込んだチップを試作したところ、チップ内部で液漏れが生じた。そこで、本研究では透析膜の端に空洞の流路を構築し、この流路にフォトレジストSU-8を導入して紫外線で重合させて透析膜を接着させる方法を考案した。この方法を用いて作製したチップでは溶液を流しても液漏れは確認されず、マイクロ糸球体モデルを隣接した設計が可能となった。

マイクロポンプについては、まず従来モデルで発生していた溶液の揺れ戻りと、それによって流速の制御が不可能になるという問題点の解決を試みた。揺れ

戻りの原因として、循環流路の角の押し潰しが不十分である事が考えられたため、本研究では循環流路の断面の構造を半円にすることで揺れ戻りの軽減を試みた。その結果、揺れ戻りを大幅に低減する事に成功し、マイクロポンプの駆動周波数に応じて幅広い流速制御を実現した。また、このマイクロポンプによる並列した溶液の循環流路のユニット間での流速の差は小さく、マイクロポンプの改良と目的とする並列した循環を達成した。

この集積化系球体モデルを用いた透析実験については、高分子 FITC-アルブミンと低分子フルオレセインの分離が行え、低分子のみの消失過程の測定に成功し、透析実験の効率化を実現した。

集積化系球体モデルでの抗がん剤アッセイについては、血漿タンパク質結合性薬剤のドセタキセルと非結合性薬剤のチオテパをそれぞれ循環させて作用させた際の死細胞率を測定した。その結果、ドセタキセルでは死細胞率は高く、チオテパでは低い値を示し体内での薬剤の性質に一致した結果を得ることに成功した。また、アッセイの誤差は従来のマイクロモデルと比較して大幅に小さくなり、アッセイの煩雑な操作の改善や効率化が行えたと評価した。本研究では1つのマイクロポンプで3つのユニットを並列駆動させるシステムを構築したが、今後ユニットの数を増やすことでさらなる効率化を行うことも可能だと考えられる。

このような集積化は、同様の実験系を用いたマイクロチップの研究を概念実証の段階から実用化・商品化にする上で非常に有用であると考えられる。新薬開発の効率化において高機能なバイオアッセイのニーズが高まっているが、マイクロチップによるバイオアッセイの高機能化は、流体操作やチップ内での細胞培養・測定といったマイクロチップ特有の煩雑な操作が伴う。実用化や商品化において、マイクロチップや流体の専門家のみが扱えるようなデバイスや実験系は望ましくなく、マイクロチップのアッセイの操作を簡易で効率的にする事が必要であると考えられる。本研究では、同様のマイクロポンプなどの実験系を用いた様々なバイオアッセイへの応用も期待でき、マイクロチップの分野が抱える煩雑な送液系による操作の煩雑さを解決しうる1つの手段として有効であると考えられる。今後よりマイクロチップでのアッセイを実用化するためには、マイクロチップの実験系を1つの装置内に組み込むための検討が必要だと考えられる。

マイクロ糸球体モデルでのイヌリンの定量では、チップから排泄されたイヌリンを回収し、ELISA によって定量することでイヌリンの定量を行った。しかし、イヌリンのマイクロ糸球体モデルからの排泄速度は、人体に比べて非常に遅い結果が得られたため、排泄速度を人体に近づけるための流路設計の検討を行った。その結果、透析部の面積を広くするための流路構造やチップの作製法を検討することで、従来のモデルよりも排泄速度が速い蛇行モデルの開発に成功した。開発した蛇行モデルでの透析実験を行った所、低分子のフルオレセインは 10 時間以内にチップから排泄され、人体の低分子の排泄速度に近づけることに成功した。

腎臓の糸球体と尿細管の機能を組み合わせたマイクロ腎排泄モデルの開発においては、はじめに尿細管の機能を模倣した部位を開発した。Caco-2 細胞をモデル細胞として用い、膜の表側に培養したものを再吸収モデル、裏側に培養したものを分泌モデルとして開発し、トランスポーターによる能動輸送をチップ内で測定することに成功した。

糸球体と分泌を組み合わせたマイクロ腎排泄モデルでの分泌+透析実験では、P-gp の基質でない Calcein は透析部のみで排泄され、P-gp の基質である Rh123 は濾過と分泌の 2 つの過程を受けて排泄される結果を得ることに成功した。

以上の事より、糸球体濾過と尿細管分泌の 2 つの腎排泄の過程を模倣したモデルの概念実証が行えた。この研究は、腎臓の糸球体及び尿細管の薬物動態を研究するツールとしての応用が期待される。臨床での採尿など試験では、尿細管での分泌量と再吸収量を直接測定する事ができないため[3]、人体での腎排泄の薬物動態を予想する事は難しい。本研究で概念実証した糸球体と分泌の 2 つの過程を組み合わせたマイクロ腎排泄モデルは、そのような測定が困難な排泄量の測定などに応用できると考えられる。さらに、開発したマイクロ腎排泄モデル内で薬剤の標的を培養することで、血漿タンパク質の結合性だけでなく薬剤相互作用を考慮に入れたバイオアッセイが実現できる可能性がある。

以上のようなマイクロ腎分泌モデルの応用を実現するためには、トランスポーターの発現が良好な尿細管由来の細胞株の選定、透析部と分泌部の面積比の検討、循環流路からの排泄された薬剤の定量などが必要であると考えられる。尿細管細胞株の選定においては、P-gp だけではなく OCT-1 など、薬剤の尿細管分泌に関わる様々なトランスポーターの発現が安定している事が望ましい。透析部と分泌部の面積比については、分泌を受ける既知の薬剤の血中濃度などを参考にする事で、臨床での値に近づける事が可能になると考えられる。また、チップから排泄された薬剤の定量は、排泄液をサンプリングし HPLC で測定して循環流路内の濃度を見積もるなどの事が行えれば、開発したデバイスを用いて薬剤相互作用における体内の血中濃度の予想が可能になると考えられる。

7章 参考文献

- [1] Frank, R. and R. Hargreaves. (2003), 'Clinical Biomarkers in Drug Discovery and Development', *Nature Reviews Drug Discovery* Vol. 2, No. 7, pp. 566-580.
- [2] Kola, I. and J. Landis. (2004), 'Can the Pharmaceutical Industry Reduce Attrition Rates?', *Nature Reviews Drug Discovery* Vol. 3, No. 8, pp. 711-715.
- [3] 杉山 雄一(2008): “分子薬物動態学” : (南山堂):
- [4] Kramer, J. A., J. E. Sagartz and D. L. Morris. (2007), 'The Application of Discovery Toxicology and Pathology Towards the Design of Safer Pharmaceutical Lead Candidates', *Nature Reviews Drug Discovery* Vol. 6, No. 8, pp. 636-649.
- [5] 北森武彦(2005): “マイクロ化学チップの技術と応用” : (丸善株式会社):p.59,
- [6] Terry, S. C., J. H. Jerman and J. B. Angell. (1979), 'Gas-Chromatographic Air Analyzer Fabricated on a Silicon-Wafer', *Ieee Transactions on Electron Devices* Vol. 26, No. 12, pp. 1880-1886.
- [7] Manz, A., N. Graber and H. M. Widmer. (1990), 'Miniaturized Total Chemical-Analysis Systems - a Novel Concept for Chemical Sensing', *Sensors and Actuators B-Chemical* Vol. 1, No. 1-6, pp. 244-248.
- [8] Hughes, A. J. and A. E. Herr. (2012), 'Microfluidic Western Blotting', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 109, No. 52, pp. 21450-21455.
- [9] Gossett, D. R., W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini and D. Di Carlo. (2010), 'Label-Free Cell Separation and Sorting in Microfluidic Systems', *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Vol. 397, No. 8, pp. 3249-3267.
- [10] Wolfe, D. B., R. S. Conroy, P. Garstecki, B. T. Mayers, M. A. Fischbach, K. E. Paul, M. Prentiss and G. M. Whitesides. (2004), 'Dynamic Control of Liquid-Core/Liquid-Cladding Optical Waveguides', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* Vol. 101, No. 34, pp. 12434-12438.
- [11] Fu, A. Y., H. P. Chou, C. Spence, F. H. Arnold and S. R. Quake. (2002), 'An Integrated Microfabricated Cell Sorter', *Analytical Chemistry* Vol. 74, No. 11, pp. 2451-2457.
- [12] Sato, K., A. Egami, T. Odake, M. Tokeshi, M. Aihara and T. Kitamori. (2006), 'Monitoring of Intercellular Messengers Released from Neuron Networks Cultured in a Microchip', *Journal of Chromatography A* Vol. 1111, No. 2, pp. 228-232.
- [13] Goto, M., K. Sato, A. Murakami, M. Tokeshi and T. Kitamori. (2005), 'Development of a Microchip-Based Bioassay System Using Cultured Cells', *Analytical*

Chemistry Vol. 77, No. 7, pp. 2125-2131.

- [14] Tokuyama, T., S. Fujii, K. Sato, M. Abo and A. Okubo. (2005), 'Microbioassay System for Antiallergic Drug Screening Using Suspension Cells Retaining in a Poly(Dimethylsiloxane) Microfluidic Device', *Analytical Chemistry* Vol. 77, No. 10, pp. 3309-3314.
- [15] Goto, M., T. Tsukahara, K. Sato and T. Kitamori. (2008), 'Micro- and Nanometer-Scale Patterned Surface in a Microchannel for Cell Culture in Microfluidic Devices', *Analytical and Bioanalytical Chemistry* Vol. 390, No. 3, pp. 817-823.
- [16] Huh, D., B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin and D. E. Ingber. (2010), 'Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip', *Science* Vol. 328, No. 5986, pp. 1662-1668.
- [17] Allen, J. W., S. R. Khetani and S. N. Bhatia. (2005), 'In Vitro Zonation and Toxicity in a Hepatocyte Bioreactor', *Toxicological Sciences* Vol. 84, No. 1, pp. 110-119.
- [18] Imura, Y., Y. Asano, K. Sato and E. Yoshimura. (2009), 'A Microfluidic System to Evaluate Intestinal Absorption', *Analytical Sciences* Vol. 25, No. 12, pp. 1403-1407.
- [19] Kim, H. J., D. Huh, G. Hamilton and D. E. Ingber. (2012), 'Human Gut-on-a-Chip Inhabited by Microbial Flora That Experiences Intestinal Peristalsis-Like Motions and Flow', *Lab on a Chip* Vol. 12, No. 12, pp. 2165-2174.
- [20] Torisawa, Y. S., C. S. Spina, T. Mammoto, A. Mammoto, J. C. Weaver, T. Tat, J. J. Collins and D. E. Ingber. (2014), 'Bone Marrow-on-a-Chip Replicates Hematopoietic Niche Physiology in Vitro', *Nature Methods* Vol. 11, No. 6, pp. 663-+.
- [21] Yeon, J. H., H. R. Ryu, M. Chung, Q. P. Hu and N. L. Jeon. (2012), 'In Vitro Formation and Characterization of a Perfusable Three-Dimensional Tubular Capillary Network in Microfluidic Devices', *Lab on a Chip* Vol. 12, No. 16, pp. 2815-2822.
- [22] Griep, L. M., F. Wolbers, B. de Wagenaar, P. M. ter Braak, B. B. Weksler, I. A. Romero, P. O. Couraud, I. Vermes, A. D. van der Meer and A. van den Berg. (2013), 'Bbb on Chip: Microfluidic Platform to Mechanically and Biochemically Modulate Blood-Brain Barrier Function', *Biomedical Microdevices* Vol. 15, No. 1, pp. 145-150.
- [23] Marx, U., H. Walles, S. Hoffmann, G. Lindner, R. Horland, F. Sonntag, U. Klotzbach, D. Sakharov, A. Tonevitsky and R. Lauster. (2012), 'Human-on-a-Chip' Developments: A Translational Cutting-Edge Alternative to Systemic Safety Assessment and Efficiency Evaluation of Substances in Laboratory Animals and Man?', *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* Vol. 40, No. 5, pp. 235-257.
- [24] Skardal, A., T. Shupe and A. Atala. (2016), 'Organoid-on-a-Chip and Body-on-a-Chip Systems for Drug Screening and Disease Modeling', *Drug Discovery Today* Vol. 21, No. 9, pp. 1399-1411.

- [25] Imura, Y., Y. Asano, K. Sato and E. Yoshimura. (2009), 'A Microfluidic System to Evaluate Intestinal Absorption', *Analytical Sciences* Vol. 25, No. 12, pp. 1403-1407.
- [26] Maschmeyer, I., A. K. Lorenz, K. Schimek, T. Hasenberg, A. P. Ramme, J. Hubner, M. Lindner, C. Drewell, S. Bauer, A. Thomas, N. S. Sambo, F. Sonntag, R. Lauster and U. Marx. (2015), 'A Four-Organ-Chip for Interconnected Long-Term Co-Culture of Human Intestine, Liver, Skin and Kidney Equivalents', *Lab on a Chip* Vol. 15, No. 12, pp. 2688-2699.
- [27] Paoli, R. and J. Samitier. (2016), 'Mimicking the Kidney: A Key Role in Organ-on-Chip Development', *Micromachines* Vol. 7, No. 7.
- [28] 坂井 建雄 (2013): “腎臓のはなし 130 グラムの臓器の大きな役割”(中公新書)
- [29] 寺田智祐・乾賢一(2001): “ペプチドトランスポーターファミリー”, *蛋白質核酸酵素*, Vol. 14, No. 5, pp621-628.
- [30] Morrissey, K. M., S. L. Stocker, M. B. Wittwer, L. Xu and K. M. Giacomini. (2013), 'Renal Transporters in Drug Development', In P. A. Insel (Ed.), *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Vol 53, 2013, Annual Reviews.
- [31] Fromm, M. F., R. B. Kim, C. M. Stein, G. R. Wilkinson and D. M. Roden. (1999), 'Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport - a Unifying Mechanism to Explain the Interaction between Digoxin and Quinidine', *Circulation* Vol. 99, No. 4, pp. 552-557.
- [32] Hager, W. D., P. Fenster, M. Mayersohn, D. Perrier, P. Graves, F. I. Marcus and S. Goldman. (1979), 'Digoxin-Quinidine Interaction - Pharmacokinetic Evaluation', *New England Journal of Medicine* Vol. 300, No. 22, pp. 1238-1241.
- [33] Essig, M., F. Terzi, F. M. Burtin and G. Friedlander. (2001), 'Mechanical Strains Induced by Tubular Flow Affect the Phenotype of Proximal Tubular Cells', *American Journal of Physiology-Renal Physiology* Vol. 281, No. 4, pp. F751-F762.
- [34] Baudoin, R., L. Griscom, M. Monge, C. Legallais and E. Leclerc. (2007), 'Development of a Renal Microchip for in Vitro Distal Tubule Models', *Biotechnology Progress* Vol. 23, No. 5, pp. 1245-1253. Jang, K. J. and K. Y. Suh. (2010), 'A Multi-Layer Microfluidic Device for Efficient Culture and Analysis of Renal Tubular Cells', *Lab on a Chip* Vol. 10, No. 1, pp. 36-42.
- [35] Jang, K. J., A. P. Mehr, G. A. Hamilton, L. A. McPartlin, S. Y. Chung, K. Y. Suh and D. E. Ingber. (2013), 'Human Kidney Proximal Tubule-on-a-Chip for Drug Transport and Nephrotoxicity Assessment', *Integrative Biology* Vol. 5, No. 9, pp. 1119-1129.
- [36] Chee Ping Ng, Yuhang Zhuang, Alex Wei Haw Lin, and Jeremy Choon Meng Teo. (2013), 'A Fibrin-Based Tissue-Engineered Renal Proximal Tubule for Bioartificial

Kidney Devices: Development, Characterization and In Vitro Transport Study', *International Journal of Tissue Engineering*, Vol 2013, pp. 1-10.

[37] Ferrell, N., K. B. Ricci, J. Groszek, J. T. Marmorstein and W. H. Fissell. (2012), 'Albumin Handling by Renal Tubular Epithelial Cells in a Microfluidic Bioreactor', *Biotechnology and Bioengineering* Vol. 109, No. 3, pp. 797-803.

[38] Ould-Dris, A., P. Paullier, L. Griscom, C. Legallais and E. Leclerc. (2010), 'Analysis of the Mass Transfers in an Artificial Kidney Microchip', *Journal of Membrane Science* Vol. 352, No. 1-2, pp. 116-125.

[39] Snouber, L. C., S. Jacques, M. Monge, C. Legallais and E. Leclerc. (2012), 'Transcriptomic Analysis of the Effect of Ifosfamide on Mdkc Cells Cultivated in Microfluidic Biochips', *Genomics* Vol. 100, No. 1, pp. 27-34.

[40] Zhu, W., J. W. Li and J. F. Liu. (2013), 'The Cell Engineering Construction and Function Evaluation of Multi-Layer Biochip Dialyzer', *Biomedical Microdevices* Vol. 15, No. 5, pp. 781-791.

[41] Weinberg, E., M. Kaazempur-Mofrad and J. Borenstein. (2008), 'Concept and Computational Design for a Bioartificial Nephron-on-a-Chip', *International Journal of Artificial Organs* Vol. 31, No. 6, pp. 508-514.

[42] Wei, Z. J., P. K. Amponsah, M. Al-Shatti, Z. H. Nie and B. C. Bandyopadhyay. (2012), 'Engineering of Polarized Tubular Structures in a Microfluidic Device to Study Calcium Phosphate Stone Formation', *Lab on a Chip* Vol. 12, No. 20, pp. 4037-4040.

[43] Imura, Y., E. Yoshimura and K. Sato. (2013), 'Microcirculation System with a Dialysis Part for Bioassays Evaluating Anticancer Activity and Retention', *Analytical Chemistry* Vol. 85, No. 3, pp. 1683-1688.

[44] Yamada, M., Sasaki, C., Isomura, T., and Seki, M. (2003), 'Microfluidic reactor array for high-throughput screenings of protein crystallization conditions', *Micro Total Analysis Systems* Vol. 7, No. 1, pp. 49-452.

[45] Folch, A., Jo, B.H., Hurtado, O., Beebe, D.J. and Toner, M. (2000), 'Microfabricated elastomeric stencils for micropatterning cell cultures', *Journal of biomedical materials research*, Vol. 52, pp. 346-353.

[46] 作田 悠 (2014) : “マイクロ循環器モデルの開発とバイオアッセイへの応用 “、群馬大学大学院 修士論文

[47] Duffy, D.C. McDonald, J.C, Schueller, O.J A., and Whitesides, G.M (1998), 'Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)', *Analytical Chemistry*, Vol.70, pp. 4974-4984.

[48] Abbasi, F., Mirzadeh, H., Katbad, A.A (2001)., 'Modification of polysiloxane polymers for biomedical applications: a review', *Polymer International*, Vol. 50, No. 12,

p.p 1279-1287.

- [49] Ciocca, D. R., S. A. W. Fuqua, S. Locklim, D. O. Toft, W. J. Welch and W. L. McGuire. (1992), 'Response of Human Breast-Cancer Cells to Heat-Shock and Chemotherapeutic Drugs', *Cancer Research* Vol. 52, No. 13, pp. 3648-3654.
- [50] Troutman, M. D. and D. R. Thakker. (2003), 'Efflux Ratio Cannot Assess P-Glycoprotein-Mediated Attenuation of Absorptive Transport: Asymmetric Effect of P-Glycoprotein on Absorptive and Secretory Transport across Caco-2 Cell Monolayers', *Pharmaceutical Research* Vol. 20, No. 8, pp. 1200-1209.
- [51] van Maanen, M. J., C. J. M. Smeets and J. H. Beijnen. (2000), 'Chemistry, Pharmacology and Pharmacokinetics of N,N',N'-Triethylenethiophosphoramidate (Thiotepa)', *Cancer Treatment Reviews* Vol. 26, No. 4, pp. 257-268.
- [52] Morse, D. L., H. Gray, C. M. Payne and R. J. Gillies. (2005), 'Docetaxel Induces Cell Death through Mitotic Catastrophe in Human Breast Cancer Cells', *Molecular Cancer Therapeutics* Vol. 4, No. 10, pp. 1495-1504.
- [53] Declerck, L. S., C. H. Bridts, A. M. Mertens, M. M. Moens and W. J. Stevens. (1994), 'Use of Fluorescent Dyes in the Determination of Adherence of Human-Leukocytes to Endothelial-Cells and the Effect of Fluorochromes on Cellular Function', *Journal of Immunological Methods* Vol. 172, No. 1, pp. 115-124.
- [54] Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani and C. Riccardi. (1991), 'A Rapid and Simple Method for Measuring Thymocyte Apoptosis by Propidium Iodide Staining and Flow-Cytometry', *Journal of Immunological Methods* Vol. 139, No. 2, pp. 271-279.
- [55] 井村祐己 (2010) : “バイオアッセイのためのマイクロ消化器・循環器モデルの開発” 東京大学修士論文
- [56] Chueh, B. H., D. Huh, C. R. Kyrtos, T. Houssin, N. Futai and S. Takayama. (2007), 'Leakage-Free Bonding of Porous Membranes into Layered Microfluidic Array Systems', *Analytical Chemistry* Vol. 79, No. 9, pp. 3504-3508.
- [57] Unger, M. A., H. P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer and S. R. Quake. (2000), 'Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography', *Science* Vol. 288, No. 5463, pp. 113-116.
- [58] Reubi, F. C., N. Gossweiler and R. Gurtler. (1966), 'Renal Circulation in Man Studied by Means of a Dye-Dilution Method', *Circulation* Vol. 33, No. 3, pp. 426-442.
- [59] Alf, S. A., R. J. Rubin, B. F. Miller, (1938), 'A Direct Colorimetric Method For The Determination of Inulin in Blood and Urine', *Journal of Biological Chemistry*, Vol. 126, pp. 589-593.
- [60] 折田義正 (2007) : “イヌリンクリアランス測定法”モダンメディア 53 巻、

2号

- [61] Prescott, L. F., J. A. N. McAuslane and S. Freestone. (1991), 'The Concentration-Dependent Disposition and Kinetics of Inulin', *European Journal of Clinical Pharmacology* Vol. 40, No. 6, pp. 619-624.
- [62] 株式会社富士薬品 (2013) : “腎機能検査用薬 イヌリード (イヌリン注射薬)” 医薬品インタビューフォーム
- [63] Perloff, M. D., E. Stormer, L. L. von Moltke and D. J. Greenblatt. (2003), 'Rapid Assessment of P-Glycoprotein Inhibition and Induction in Vitro', *Pharmaceutical Research* Vol. 20, No. 8, pp. 1177-1183.
- [64] Kimura, H., T. Yamamoto, H. Sakai, Y. Sakai and T. Fujii. (2008), 'An Integrated Microfluidic System for Long-Term Perfusion Culture and on-Line Monitoring of Intestinal Tissue Models', *Lab on a Chip* Vol. 8, No. 5, pp. 741-746.
- [65] Troutman, M. D. and D. R. Thakker. (2003), 'Efflux Ratio Cannot Assess P-Glycoprotein-Mediated Attenuation of Absorptive Transport: Asymmetric Effect of P-Glycoprotein on Absorptive and Secretory Transport across Caco-2 Cell Monolayers', *Pharmaceutical Research* Vol. 20, No. 8, pp. 1200-1209.
- [66] Albrecht, C., J. I. Elliott, A. Sardini, T. Litman, B. Stieger, P. J. Meier and C. F. Higgins. (2002), 'Functional Analysis of Candidate Abc Transporter Proteins for Sitosterol Transport', *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* Vol. 1567, No. 1-2, pp. 133-142.
- [67] Srivalli, K. M. R. and P. K. Lakshmi. (2012), 'Overview of P-Glycoprotein Inhibitors: A Rational Outlook', *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* Vol. 48, No. 3, pp. 353-367.
- [68] Sugihara, N., K. Toyama, A. Michihara, K. Akasaki, H. Tsuji and K. Furuno. (2006), 'Effect of Benzo[a]Pyrene on P-Glycoprotein-Mediated Transport in Caco-2 Cell Monolayer', *Toxicology* Vol. 223, No. 1-2, pp. 156-165.

8章 謝辞

本研究を遂行できたのは、ひとえに未熟な私を支えてくださった皆様のおかげです。この場を借りて御礼申し上げます。

角田欣一教授には研究面だけでなく、健康面なども頻繁に気にかけてくださり、長い研究室生活を見守ってくださいました。毎年4月の初めのゼミでの「研究室のあり方」のお話は、大変心に残っております。温かいご指導いただいた事を深く感謝致します。

そして佐藤記一准教授には日頃の研生活から研究に関するアドバイスなど、ありとあらゆる面でお世話になりました。私が研究室に入った年に佐藤先生が赴任され、マイクロチップのノウハウが何もないところから大変熱心に指導していただきました。至らない点が多い私ですが、最後まで見捨てずに指導していただきました事を心より感謝しております。

また、分析化学研究室の先輩・後輩・同期にも多方面で支えていただきました。同期の大久保優太君、村田博康君、阿部隼司君、後輩の福田隼也君、細田晃君、川口聖矢君、高橋杏奈さんには特にお世話になりました。その他、ここでは書き尽くせませんが、当研究室をはじめこの6年間の研生活でお世話になった皆様は一生忘れることは出来ない私の宝物です。

最後に、私をここまで育ててくださった家族に心より感謝します。