

## 腸内環境を模倣したマイクロデバイスの開発

掛川 貴弘

横浜国立大学大学院工学研究院 工学研究員技術補佐員

(現 大日本印刷株式会社研究開発センター)

### 緒言

微生物間または、微生物と細胞間の相互作用を明らかにすることは、食の科学技術の発展において重要である。特に、腸内には無数の細菌が存在していることが知られており、腸内マイクロバイオームの善玉菌と悪玉菌のバランスが崩壊することで、炎症やうつ病などの疾患、肥満や免疫機能の低下が引き起こされる。そこで本研究では、生体外で腸モデルを構築することを目的とした。腸内細菌の99%が嫌気性生物である一方、バリア機能をもつ腸上皮細胞には低酸素限界濃度で培養することが求められる。つまり、腸内を生体外で再現するためには、微生物群の培養環境中の酸素濃度の測定・制御が重要となる。また、その他の外的因子として、抗生物質の長期投与により、腸炎が引き起こされることが知られている。これは、抗生物質の投与により、その薬剤に感受性の細菌数は激減するものの、耐性をもつ微生物は腸内で異常増殖するからである。つまり、抗生物質と微生物群との関係を生体外で評価することができれば、腸炎などの炎症反応を抑制・予防できる可能性がある。そこで本研究では、生体外で腸内のモデルを作製するために、以下の3つの要素技術の確立に取り組んだ。つまり、(1) 腸膜を模擬した細胞シートの作製と回収、(2) 微生物群中の酸素濃度の測定、(3) 抗生物質の濃度による微生物への影響をハイスループットに評価可能なマイクロデバイスの開発である。

### 結果および考察

筆者らは、電気化学的な反応に基づく細胞脱離技術を開発してきた<sup>1)</sup>。この基盤技術は、金-チオール結合を介して金表面に形成した自己組織化単分子膜の還元脱離反応を利用しており、素早い細胞脱離が可能な独創的な技術である。この原理は、金-チオール結合により金電極表面に単分子層を形成し、これを介して接着させた細胞を、金-チオール結合を電気的に切断することで脱離

させるものである。これまでに、金電極上で密な分子層を形成可能な自己組織化ペプチドの設計を行ってきた。これを介して接着した細胞が、5分間の電位印加により非侵襲的に脱離可能であることを報告している。一方で、実はペプチド分子のみの脱離の場合、わずか数秒の電位印加で脱離することが電気化学的な解析によりすでにわかっている。すなわち、原理的には細胞シートも秒単位で脱離できる可能性が残されている。そこで、本研究ではまず、素早い細胞脱離を実現するために、オリゴペプチドの配列について分子動力学計算を用いてシミュレートした。具体的には、80種類のアミノ酸の組み合わせについて、バルク液中ではオリゴペプチドは凝集せず、金表面に結合した後に、安定したコンフォメーションをとる配列を探索した。このオリゴペプチド設計で最も重要な点は、リジン (K、+電荷) およびグルタミン酸 (E、-電荷) の繰り返し配列 (KEKE、KEKEKE等) を導入し、隣接する分子間で静電的な引力を生じさせ、金表面上で密な分子層を形成するよう設計したことである。シミュレーションの結果、CGGGKEKEKEKGRGDSPの配列を用いると、オリゴペプチドが密に金表面を覆い、細胞接着配列GRGDSPが表面に提示されることが示された (図1)。実際にこのオリゴペプチドを修飾した基板で細胞脱離を評価したところ、従来法と比較してより迅速な細胞脱離が実現された。次に、電極形状を工夫することにより、より効率的な細胞シートの脱離技術を確立した。細胞脱離が遅延する要因として、細胞自体の電気的抵抗が考えられる。細胞のような巨大な物体が接着していると、電極全体への均一な電位印加が妨げられる可能性がある。この予測は、細胞脱離の際に、細胞が周辺部から徐々に脱離するという顕微鏡観察結果に基づくものである。そこで、ピラー構造を有する電極を作製し、細胞直下の電極へのイオン流入を促進する工夫を施した。その結果、1分の電位印加で75%の細胞が脱離し、3分間の電位印加により、ほぼ全ての細胞を脱離さ

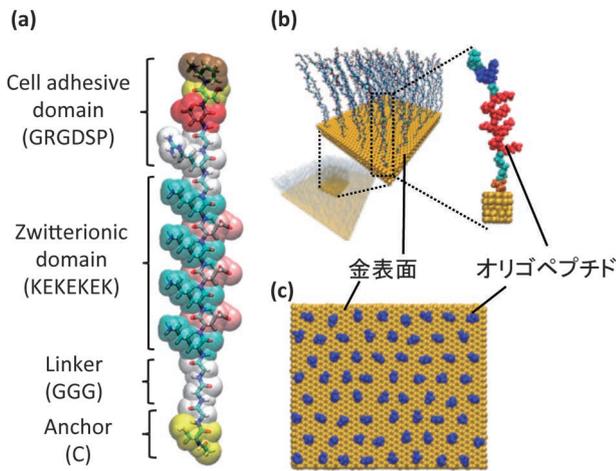


図1 オリゴペプチドの設計

(a) 設計したオリゴペプチド、(b) 金表面に自己組織化したオリゴペプチド層、(c) 規則的に配置したオリゴペプチド。

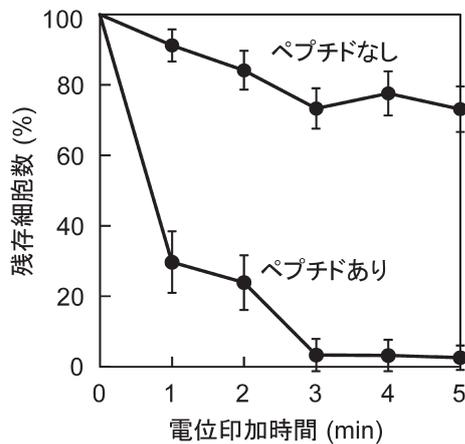


図2 ピラー電極を用いた電気化学細胞脱離

初期接着細胞数を100%とした時の電位印加時間による細胞脱離割合。

せることができた (図2)。さらに、基板表面全体を細胞が覆うまで培養し、細胞シートを形成させ、1分間電位を印加することで、細胞シートを回収できることを示した (図3)。回収した細胞シートは、良好な生存率を示し、組織構築には必要不可欠である細胞間のタイトジャンクションも保っていることも確認した。以上の検討により、腸膜を模倣した細胞シート作製、回収の可能性が示された。

続いて、微生物の培養環境中の酸素濃度を測定する方法を確立した。現在までに酸素濃度を測定する様々なセンサーが開発されているが、本研究においては微生物群を含む微小環境中の酸素濃度をリアルタイムに測定できる手法が求められる。そこで、数あるセンサーの中でも

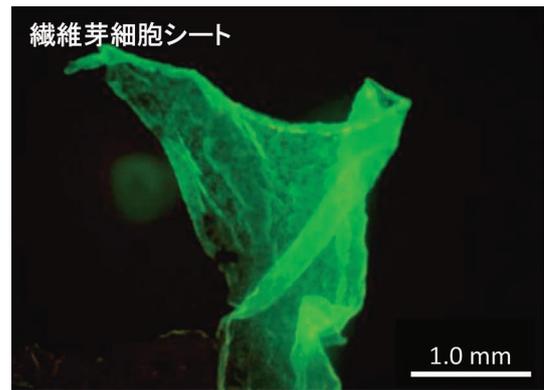


図3 細胞シートの回収

電気化学的細胞脱離で回収した細胞シートの蛍光顕微鏡像、緑：生細胞、赤：死細胞。

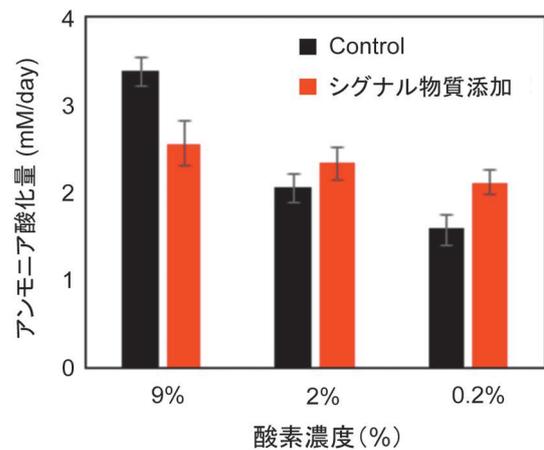


図4 酸素濃度とアンモニア酸化量

シグナル物質の添加によるアンモニア酸化量。

光ファイバーを用いた酸素濃度計を使用した。この手法の特徴は、蛍光クエンチング現象を利用しており、測定対象の酸素を消費せずに測定できる点である。そこで、微生物の培養液の体積を変化させた培養液中の酸素濃度の測定について検討した。その結果、培養体積が大きくなるにつれ、酸素濃度が減少することを確認し、リアルタイムで酸素濃度を計測できることを示した。さらに、微生物懸濁液中にシグナル物質を添加し、培地中のアンモニア酸化量を測定した結果、酸素濃度が低い培養系の微生物群にシグナル物質を添加した系において、アンモニア酸化量が向上することが示された (図4)。つまり、酸素濃度をモニタリング・制御した環境下で微生物を培養することで、より生体内に近い培養環境を実現できる可能性が示された。

さらに、抗生物質の濃度とその効果をハイスループッ

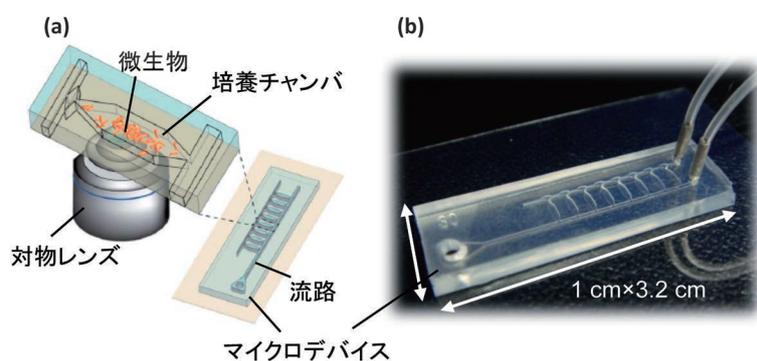


図5 マイクロデバイス

(a) マイクロデバイスの概念図、(b) 作製したマイクロデバイス。

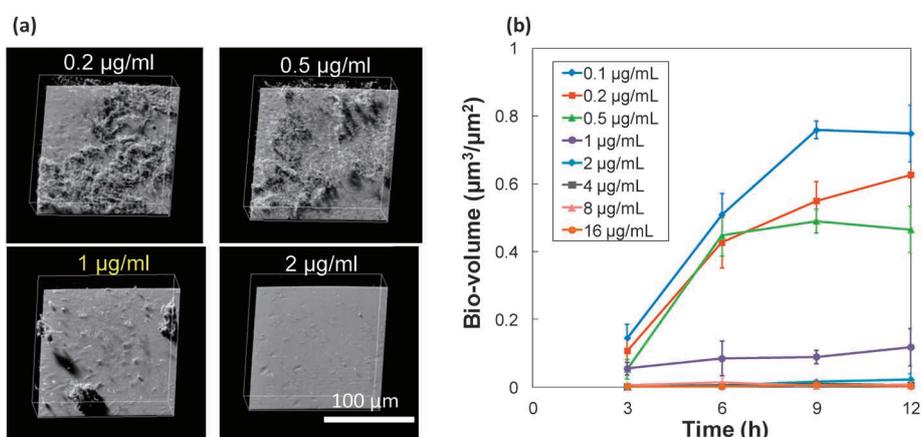


図6 マイクロデバイス中での微生物培養

(a) 微生物の走査型電子顕微鏡像、(b) 抗生物質の濃度の違いによる微生物の増殖評価。

トに評価可能なマイクロデバイスの開発に取り組んだ。微小な培養体積中で評価することで、一度に大量の条件下で評価できるだけでなく、評価に用いるサンプル量や試薬にかかるコストなども抑えることができる。そこで、半導体作製にも用いる微細加工技術で、体積が440 nLとなるマイクロデバイスを作製した(図5)。このマイクロデバイス作製のポイントは、表面張力を利用して、独立した培養チャンバへ微生物を均一に導入する機構を開発した点である。それぞれの培養チャンバは独立した状態で、少なくとも24時間以上培養できることを確認している。さらに、種々の濃度の抗生物質を個々のマイクロデバイスに固定し、様々な抗生物質濃度下で微生物を培養できる工夫を施した。その結果、抗生物質濃度に依存して、微生物の増殖速度に影響することがわかった(図6)。このことから、微小なマイクロチャン

バ中で微生物に対する抗生物質の影響を評価できることが可能であり、細菌に対する薬剤の効果などを診断できるツールになり得る可能性が示された。

このことから、微小なマイクロチャンバ中で微生物に対する抗生物質の影響を評価できることが可能であり、細菌に対する薬剤の効果などを診断できるツールになり得る可能性が示された。

## 謝 辞

本研究は公益財団法人三島海雲記念財団によりサポートされたものである。

## 文 献

- 1) T. Kakegawa, et al: *Tissue Eng. Part A.*, **19**, 209-298, 2013.
- 2) R. Inaba, et al: *Biomaterials.*, **30**, 3573-3579, 2009.