



本研究は、日本農芸化学会2021年度大会（仙台）における「ジュニア農芸化学会」（発表は新型コロナウイルス感染症対策のためオンライン形式で実施）に応募された研究のうち、本誌編集委員会が優れた研究として選定した6題の発表のうちの一つです。

地域資源由来のナノファイバーとデジタルモールド技術によるマイクロ流体デバイスの設計と細胞接着制御

一関工業高等専門学校未来創造工学科化学・バイオ系

上野裕太郎, 岩淵沙姫, 八重樫健成, 太田空良, 加藤千寛, 鈴木麻紘, 千葉 泉, 山火瑞生, 千田洸弥 (顧問: 戸谷一英, 二階堂 望)

各種ナノファイバー (NF) や細胞外マトリクス (ECM) をプラスチックシャーレにコートしたところ、 β -キチンNFのみでは細胞接着性が認められなかったが、ECMにより接着性が回復した。機能性食品を評価する臓器チップの製造を念頭に、3D CADと3Dプリンタによりマイクロ流路の樹脂型 (モールド) を成形し、ポリジメチルシロキサン (PDMS) 樹脂を流し込んでマイクロ流路の上部を試作した (デジタルモールド技術)。マイクロ流路上部を上記シャーレに圧着してマイクロ流路を成形し、細胞を灌流培養したところ、上記のECM/NF塗布シャーレで得られた細胞接着試験結果に合致した細胞接着性が、マイクロ流路内のECM/NF重層部分でも確認できた。

本研究の目的, 方法および結果

流れがなく拡散培養系である二次元細胞培養は、必ずしもマイクロ流体系である生体内の環境を模倣しているとは言いがたく、より生体内に近い環境での細胞評価試験系が望まれてきた。マウスをはじめとした動物実験は医薬品開発だけでなく化粧品、食品開発などの過程で利用されているが、近年、EUにおける「動物実験代替法」や化粧品分野での規制を受けて諸外国で動物実験が禁止されつつある⁽¹⁾。また、薬剤評価においては実験動物とヒトとで薬効が異なる場合があり、薬剤がヒトに効能があるか否か正確には予測できない。その結果、多くの新薬候補が臨床試験で薬効なしと判定され、研究開発費の莫大な損失となってきた。これらの問題点を解決するために、二次元培養や動物実験と、ヒト生体内の中間的なモデルとして、Organs-on-a-Chip (臓器チップ) が考案された⁽¹⁾。臓器チップは、マイクロ流路を有するUSB

フラッシュメモリサイズのポリマー製チップ上でヒト由来細胞を用いて人体内の臓器機能を正確に再現することを目指している (図1)^(2,3)。また、新型コロナウイルス阻害剤の評価にも利用され⁽⁴⁾、ウイルス感染評価系としても注目されている^(5,6)。

動物実験の代替法を模索する世界的な潮流から、機能性食品の評価もいずれ臓器チップで行われる可能性が指摘されている。食品は経口摂取により小腸で吸収されるので、市販の小腸マイクロ流体チップがこの分野に適用できる⁽⁷⁾。一方で市販のチップは、肺や腸、肝臓などの複雑な臓器モデルを作製できるが⁽⁸⁾、粘性のあるゲルや凝集塊でマイクロ流路が目詰まりする可能性がある。したがって、自在にチップの流路を成形加工する必要がある。戸谷指導教員らは三陸地域資源のイカの中骨から β -キチンNFを製造する方法を確立し^(9,10)、スキンケア化粧品として商品化している^(11,12)。われわれは、抗ウイルス活性や免疫賦活活性を有する機能性食品の評価を臓器チップ上で行うことを念頭に、地域資源とデジタルモールド技術を活用して「機能性食品評価の臓器チッププラットフォーム」を構築することを考えた。

【目的】

機能性食品の評価を臓器チップ上で行うことを念頭に、本研究では、 β -キチンNFやECMをコートしたプラスチックシャーレ (ディッシュ) とデジタルモールド技術により、3Dプリンタを用いて試作したマイクロ流路を組み合わせて、新たな細胞接着制御系の開発を目指す。

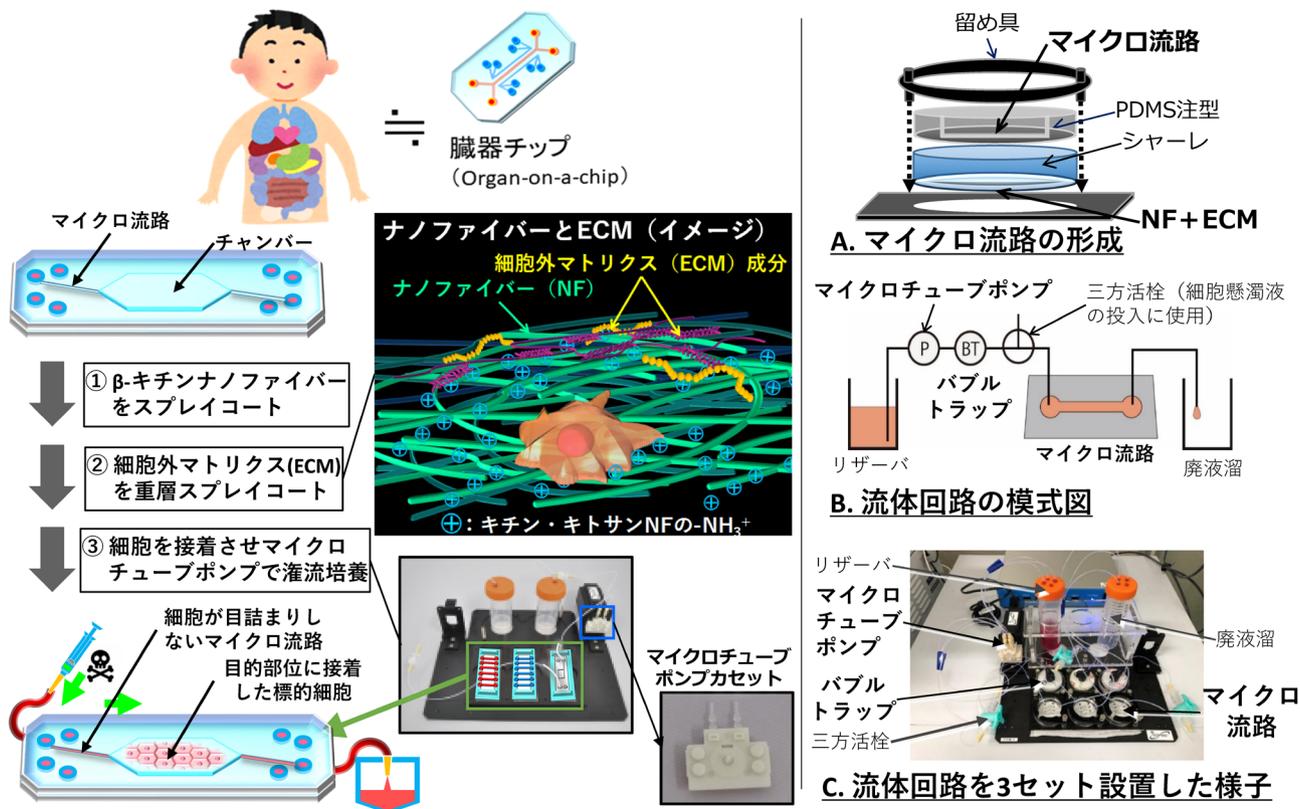


図1 ■ Organs-on-a-Chipの製造概念図(左)と実際のマイクロ流路の構築(右)

左：ナノファイバーとECMを使用した細胞接着制御デバイスの製造工程のフロー（概念図）右：PDMS樹脂をシャーレに圧着して構築したマイクロ流路と灌流培養システム *細胞外マトリクス (ECM)：細胞が足場とするフィブロネクチンやコラーゲン，ラミニン，プロテオグリカンなどの生体高分子

【材料および方法】

1. 原材料

β -キチンNFは地域資源のイカ中骨から調製した。その他のNFはスギノマシン社製「BiNFis」を使用した。

2. NFのディッシュへのコート

各種NF (β -キチン, α -キチン, キトサン, セルロース, CMC (カルボキシメチルセルロース))をマイクロスプレガンにより細胞培養用ポリスチレンディッシュ (AGCテクノグラス, IWAKI製35mm dish)へ均一にスプレーコートした。必要に応じて市販のECM (アテロコラーゲン (ニッピ製), ヒトフィブロネクチン (富士フィルム和光))を推奨法にしたがって重層した。

3. 細胞接着試験

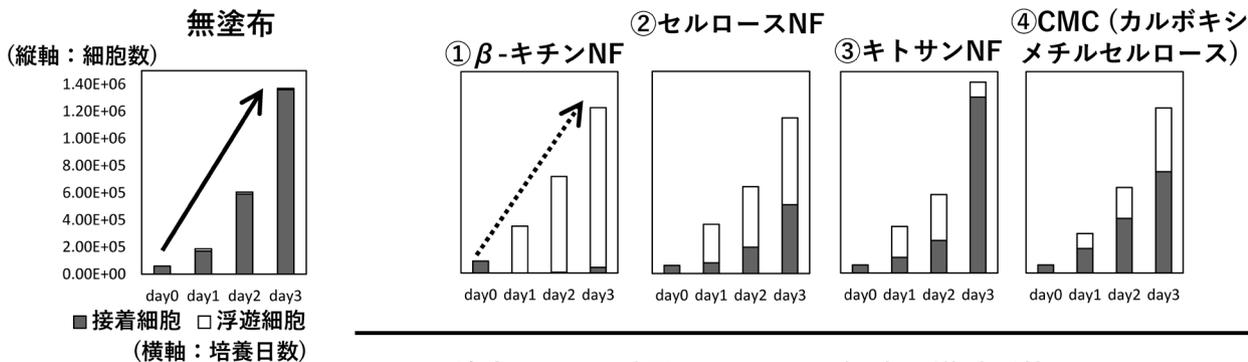
塗布シャーレは使用直前にUV照射処理15minを行い殺菌した。D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 2mLおよびHeLa細胞懸濁液200 μ Lを播種し、CO₂インキュベータ内で37 $^{\circ}$ C, 3日間から4日間培養した。細胞の様子は位相差顕微鏡 (総合倍率20倍)で観察した。培養後に培地をピペットで回収し、遠心分離で沈殿した細胞を「浮遊細胞」, シャーレをリン酸緩衝生

理食塩水 (PBS) でリンス後にトリプシン処理して剥がした細胞を「接着細胞」とした。細胞数は、細胞をトリパンブルーおよび蛍光 (AO-PI) 染色し、蛍光明視野全自動セルカウンター LUNA-FL (Logos Biosystems社)により計測した。

4. デジタルモールド技術によるマイクロ流路の試作と灌流培養

マイクロ流路の鋳型として高価で手間のかかる金型の代わりに、デジタルモールド技術で成形した樹脂型を用いた。すなわち、3D CAD (Fusion 360)でマイクロ流路の体積を何通りかに変えたモールド (樹脂型)を設計し、光硬化性のポリジェット3Dプリンタ (Stratasys社製)で樹脂型を試作した。この樹脂型にPDMS樹脂を流し込み、PDMSが硬化したら剥がして細胞培養用35mmポリスチレンディッシュに圧着しマイクロ流路を形成させた。バブルトラップも試作した。図1のように、培養液 (リザーバ)→専用マイクロチューブポンプ (アイカムス・ラボ社製)→バブルトラップ (試作)→三方活栓→マイクロ流路 (試作)→廃液チップの順につないで流体回路を構築した。CO₂インキュベータ内で

A. 各種NF塗布によるHeLa細胞の増殖形態



B. NF塗布 + ECM重層によるHeLa細胞の増殖形態

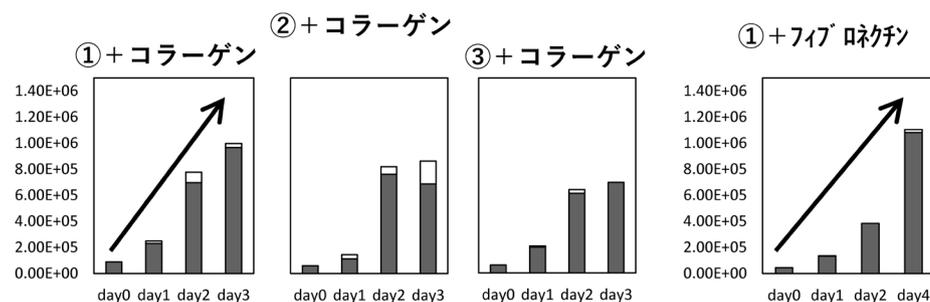


図2 ■ 各種NFとECMによるシャーレの細胞接着性回復試験

β-キチンナノファイバー (NF) だけが細胞非接着性であり、コラーゲンなどを重層した場合、細胞接着性が回復する。

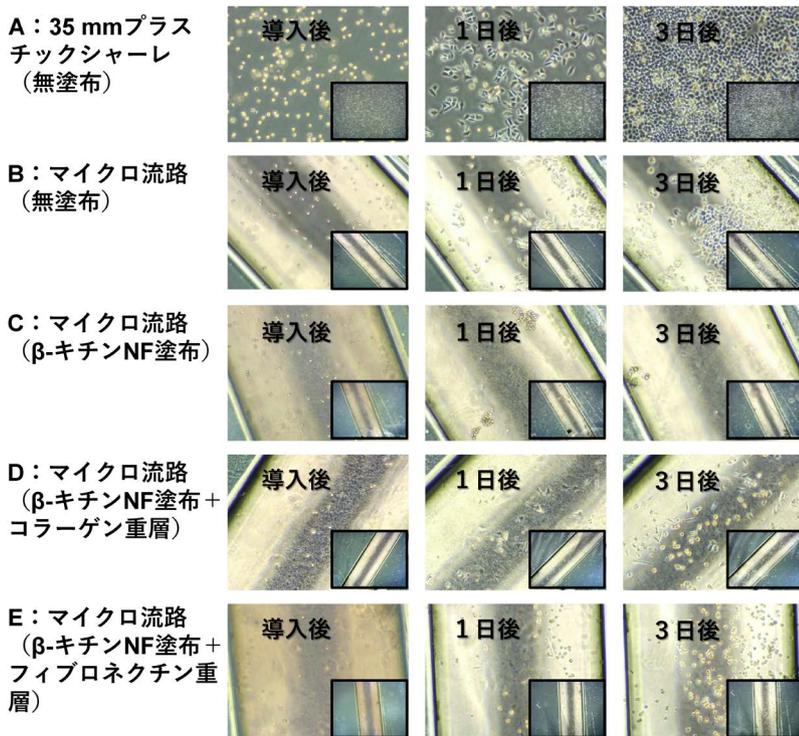


図3 ■ マイクロ流体デバイス上での細胞接着試験
画像：位相差顕微鏡観察写真画像。原画像を300%に拡大して一部をトリミングしたもの。右下の画像：原画像を縮小したもの。原画像は総合倍率20倍（対物4×，接眼10×，モニター 0.5×）にて撮影。

HeLa細胞などを灌流培養し、接着増殖した細胞を位相差顕微鏡で観察した。

【結果および考察】

1. NFのスプレーコートと細胞接着性

β-キチンNFは剪断応力により粘性が低下し液状化す

るチキソトロー性を有しており、プラスチック器材へのスプレーコートが可能であった。各種NFをスプレーコートしたシャーレを使用して、HeLa細胞において、キチンNFのみが細胞接着性が極めて低いことを明らかにした(図2A)。これにより β -キチンNFでマイクロ流体デバイスをコートすることで、マイクロ流路における細胞の目詰まりを防止できると予測した^(13,14)。

2. ECMによる細胞接着性回復試験

ECMとしてコラーゲンを β -キチンNF塗布シャーレに重層したところ、細胞の接着性が回復した(図2B)⁽¹⁴⁾。

3. マイクロ流路の試作と灌流培養

デジタルモールド技術によりマイクロ流路を成形し、図1(右側)のように流体回路を構築した。これをCO₂インキュベータ内でHeLa細胞を灌流培養し、位相差顕微鏡観察した(図3)。無塗布シャーレ(A)と同様に無塗布マイクロ流路(B)では細胞が敷石状に接着し増殖した。一方で、 β -キチンNF塗布マイクロ流路(C)では細胞は接着せず流れ去った。ECMのコラーゲン(D)、フィブロネクチン(E)により細胞接着性が回復し、試作したマイクロ流路内でECM/NF塗布シャーレに合致した細胞接着性が確認できた⁽¹⁴⁾。

【結語】

1. プラスチックディッシュにおける細胞接着試験で、 β -キチンNFのみ細胞接着性がなかったが、ECMにより接着性が回復した。
2. デジタルモールド技術によりマイクロ流路を成形し細胞を灌流培養したところ、ECM/NF塗布ディッシュに合致した細胞接着性が確認できた。



本研究の意義と展望

【意義】

1959年にRussellとBurch氏によって提唱された動物実験の基準理念である「3Rの原則」(Replacement(代替), Reduction(削減), Refinement(改善))の厳格化が進んでいる。EUでの動物実験代替法の成立を受け、2009年から化粧品開発における実験動物の使用は禁止されている(SDGs目標15:陸の豊かさを守ろう, 目標12:つくる責任つかう責任)。これは化粧品分野以外にも波及することが想定され、われわれはこの潮流に沿い、臓器チップを用いた機能性食品の評価を目指している。本研究では、 β -キチンNFやECMの簡単なスプレー塗布によりマイクロ流路での細胞の目詰まりを防ぎつつ、同時に細胞接着の制御が行える可能性を示した。また、粘性や凝集性のある食品の評価には流路が細すぎ

る市販の臓器チップでは対応できないことも予想される。本研究では、デジタルモールド技術により誰でも3Dプリンタを活用して流路の拡張やオーダーメイドの臓器チップを迅速に造形できることを示した。

以上により本研究は、新型コロナウイルス(COV-19)に対する免疫や抗ウイルス活性を高める機能性食品を評価する系の構築に寄与する。機能性食品は疾病予防や健康寿命の延伸により医療費の抑制や国民のQOLを高めることが期待されている(SDGs目標3:すべての人に健康と福祉を)。さらに、水産有機廃棄物からキチンを回収し、ナノテクノロジーにより新たな機能を付加して、臓器チップへ応用することで環境負荷を低減しつつ水産業へ寄与する(SDGs目標14:海の豊かさを守ろう)。本研究はSociety 5.0を意識した異分野融合型(デジタル技術+臓器チップ)の取り組みであり、再利用可能な生物資源を有効活用して、国民の健康と地球環境にやさしいバイオフィーストな未来を目指すものである。

【展望】

日本は欧米に比べて臓器チップの分野で出遅れており、国産の臓器チップは皆無である。本研究はデジタルモールド技術により国産の臓器チッププラットフォームの開発を目指す。本研究のゴールは、デジタルモールド技術で成形したマイクロ流体デバイスに細胞を接着させ、機能性食品の免疫活性を評価して、withコロナ時代の免疫アップとイノベーションに貢献することである。粘性や凝集のある機能性食品や素材を流路の目詰まりなく導入できる臓器チップをデザインし、流れのある灌流細胞培養系で、粘膜上皮細胞や免疫細胞に与える機能を評価する。将来的には、臓器チップ上にウイルス標的細胞を配置し、抗ウイルス活性を有する機能性食品の評価系の構築を目指す。また、臓器チップに人工血管を組み込んで血管を介した評価モデルの開発にも本技術を応用したいと考えている。

謝辞:本研究は「一般財団法人東熟科学技術奨学財団」の研究助成により行われた。マイクロチューブポンプおよび灌流培養システムをサポートくださった株式会社アイカムス・ラボの小此木孝仁様、 β -キチンナノファイバーを提供くださったヤエガキ醗酵技術株式会社の山下和彦様に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) 宮崎博之, 吉山友二:日薬理誌, **151**, 48 (2018).
- 2) 研究開発の俯瞰報告書:3.2創薬基盤技術, 医薬品3.2.2生体再現技術I(臓器チップ), ライフサイエンス・臨床医学分野, 2017.
- 3) K. Ronaldson-Bouchard & G. Vunjak-Novakovic: *Cell Stem Cell*, **22**, 311 (2018).
- 4) J. Theobald, A. Ghanem, P. Wallisch, A. A. Banaeiyan, M.

- A. Andrade-Navarro, K. Taškova, M. Haltmeier, A. Kurtz, H. Becker, S. Reuter *et al.*: *ACS Biomater. Sci. Eng.*, **4**, 78 (2018). doi: org/10.1021/acsbiomaterials.7b00417
- 5) H. Tang, Y. Abouleila, L. Si, A. M. Ortega-Prieto, C. L. Mummery, D. E. Ingber & A. Mashaghi: *Trends Microbiol.*, **28**, 934 (2020).
 - 6) L. Si *et al.*: *bioRxiv*, (2020). doi: org/10.1101/2020.04.13.039917
 - 7) M. J. Workman, J. P. Gleeson, E. J. Troisi, H. Q. Estrada, S. J. Kerns, C. D. Hinojosa, G. A. Hamilton, S. R. Targan, C. N. Svendsen & R. J. Barrett: *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.*, **5**, 669 (2018). doi: org/10.1016/j.jcmgh.2017.12.008
 - 8) M. Kasendra, A. Tovaglieri, A. Sontheimer-Phelps, S. Jalili-Firoozinezhad, A. Bein, A. Chalkiadaki, W. Scholl, C. Zhang, H. Rickner, C. A. Richmond *et al.*: *Sci. Rep.*, **8**, 2871 (2018). doi: org/10.1038/s41598-018-21201-7
 - 9) 特許第6497740号:「 β -キチンナノファイバーおよびその製造方法」, 戸谷一英ら他11名
 - 10) S. Suenaga, N. Nikaido, K. Totani, K. Kawasaki, Y. Ito, K. Yamashita & M. Osada: *Int. J. Biol. Macromol.*, **91**, 987 (2016).
 - 11) 戸谷一英, 長田光正: キチン・キトサンの最新科学技術—機能性ファイバーと先端医療材料—第5章イカ中骨由来 β -キチンナノファイバーの製造と物性, 技報堂出版, 2016.
 - 12) S. Suenaga, K. Totani, Y. Nomura, K. Yamashita, I. Shimada, H. Fukunaga, N. Takahashi & M. Osada: *Int. J. Biol. Macromol.*, **102**, 358 (2017).
 - 13) 特願2020-034215:「細胞非接着性材料および細胞接着制御性材料」, 戸谷一英ら他5名
 - 14) 千田洸弥, 山火瑞生, 千葉泉, 二階堂望, 小此木孝仁, 山下和彦, 戸谷一英: 応用糖質科学, **11**, 34 B-06 (2021).

Copyright © 2022 公益社団法人日本農芸化学会
DOI: 10.1271/kagakutoseibutsu.60.44