分析化学総説

細胞チップを用いるバイオアッセイ

鳥澤 勇介¹, 珠 玖 仁¹, 安川 智之¹, 末永 智一^{®1}

Bioassay using living cells integrated on a chip

Yu-suke TORISAWA¹, Hitoshi SHIKU¹, Tomoyuki YASUKAWA¹ and Tomokazu MATSUE¹

¹ Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Aramaki, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi 980-8579

(Received 19 January 2004, Accepted 9 February 2004)

A living cell-based assay is widely used for the characterization of various cellular functions, screening of drugs and environmental monitoring. Recent progress in cell culture and micro-fabrication technologies has attracted the integration of cell culture and sensors on a chip. A bioassay using a cell chip makes it possible to evaluate small-volume samples with multitudinous characterizations, and is applicable for a rapid and simple detection system. This paper reviews cell-based bioassay using living cells integrated on a chip. The cell patterning and three-dimensional cell culture facilitates the integration of cell culture technology. These *in vitro* culture technologies are appropriate for the recapitulation of *in vivo*-like cell behavior, because of the potential to control the cell differentiation and polarity. Alternatively, the evaluation methods, such as cellular acidification, oxygen consumption and impedance measurements, are principally non-invasive, and are especially expected in the field of anticancer drug sensitivity test using a biopsy tumor.

Keywords : cell-based assay; cell chip; cell patterning; 3-dimensional cell culture; anticancer drug sensitivity test; microphysiometer; LAPS; ISFET.

1 はじめに

細胞そのものを対象としたアッセイ法は、動物実験の代替法として広く利用されるようになり、特に薬剤スクリーニングにおいては、動物実験の前段階として有効なツールとなっている。このようなアッセイを迅速・簡便に実現するために、細胞を固相基板上に配列・固定化した様々な細胞チップが提案されている^{1)~8)}。近年の微細加工技術の進歩に伴い、センサーの小型化、集積化の検討が急速に進められ、携帯型デバイス等の安価で簡便なシステム⁵⁾や、多項目でハイスループットな評価システム⁶⁾などへ展開されている。一方、細胞培養技術の進歩に伴い、細胞接着の制御によるパターン培養技術や3次元培養技術が開発され、*in vitro*において生体内環境を再現することが可能となり

つつある⁷⁾⁸⁾。生体内環境を *in vitro* で完全に再現できれば、新たな生物学的知見が得られるばかりでなく、スクリーニングにおける臨床予見性を飛躍的に向上させることが期待できる。

このような、センサー集積化技術と細胞培養技術を組み合わせた細胞チップの開発は、細胞及びセンサーを微小領域に配置することにより、少量の試料で多項目を評価するシステムの構築を目的として、様々な検討が進められている。本稿では、細胞チップを用いたバイオアッセイに関して、細胞集積化技術とアッセイ法を中心に紹介する。細胞集積化技術としては、細胞のパターン培養及び3次元培養について、アッセイ法としては非侵襲測定を可能とする pH、酸素及びインピーダンス測定について紹介する。また、細胞チップの特徴を生かした適用例として、抗がん剤感受性試験について紹介する。

¹ 東北大学大学院環境化学研究科: 980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉

Fig. 1 Schematic illustration of the procedure used to fabricate a PDMS stamp (a) and prepare the ECM protein patterns on a glass plate (b)

2 細胞パターンニング

細胞パターンニング技術は、細胞を用いたバイオセンサーや組織培養工学、基礎細胞生物学の研究に不可欠である^{7)~10)}。パターンニング培養は微細加工技術を細胞培養へ適応した手法であり、フォトリソグラフィーが広く利用されてきた^{11)~16)}。フォトレジストにより作製したパターン基板上に細胞接着性のタンパク質を塗布した後、レジストを取り除くことで、接着タンパク質のパターンが作製できる。この基板上で細胞を培養することで、任意に配列された細胞パターンが得られる。接着タンパク質には、ポリリジン、フィブロネクチン、コラーゲンなどがある。フォトリソグラフィーは、正確にパターンを作製できるものの、高額な装置を必要とし、用いる化学物質が細胞毒性を有する等の問題がある。本節ではフォトリソグラフィーに替わる細胞試料に適したパターンニング技術としてソフトリソグラフィーや電気化学リソグラフィー、誘電泳動法について紹介し、細胞パターン表面で実現可能となった細胞機能制御とその評価方法についても説明する。

2.1 ソフトリソグラフィー

Whitesides らによって、生体試料への適応性に優れたパターンニング技術としてソフトリソグラフィーが開発された¹⁷⁾¹⁸⁾。この技術は、微細加工を施したエラストマーを用いて行うことに特徴があり、エラストマーにはポリジメチルシロキサン (PDMS) が広く利用されている。PDMS は、

生体適合性に優れているばかりでなく、光及び酸素透過性であり、耐久性にも優れている。

2.1.1 Microcontact printing (μ CP) μ CP 法は、PDMS スタンプにより基板表面に細胞接着性タンパク質を転写することでパターンニングを行う (Fig. 1)¹⁹⁾²⁰⁾。Whitesides らは、金基板表面に細胞接着性のアルカンチオール自己集合単分子膜を形成させることにより、細胞のパターンニングを行っている^{19)~23)}。フォトレジストで作製したパターンを鋳型として PDMS のスタンプを作製し、金基板上にアルカンチオールのパターンを作製する。その後、アルカンチオール以外の部分には細胞外マトリックス (ECM) タンパク質の吸着をブロックする性質を有するポリエチレングリコール (PEG) を吸着させる。これにより、細胞はアルカンチオールのパターン上に選択的に接着するため、細胞のパターンが得られる。また、ガラス基板上への μ CP 法による ECM タンパク質のパターンニングも試みられている。ガラス基板上にラミニンもしくはポリリジンを μ CP 法により転写することで神経細胞のパターンニングが達成されている^{24)~27)}。Nishizawa らは、ECM タンパク質にフィブロネクチンを、ブロッキングにウシ血清アルブミンを用いることで、 μ CP 法によりガラス基板上での細胞のパターンニングを行っている (Fig. 1b)^{28)~32)}。本手法により、単一細胞レベルでのパターンニング制御に成功し、上皮細胞の電気化学計測を可能とした²⁸⁾。更に、心筋細胞のパターンニングにも成功しており、細胞間コミュニケーション評価への応用を展開している^{30)~32)}。

Fig. 2 Schematic top-view of the fluidic channels used for micropatterning

μ CP 法は、2 種類程度の物質のパターニングには非常に有効であり、広く利用されている。しかし、多種類のパターニングを形成するのは困難である。また、PDMS が疎水性であるために水溶液がなじみ難いこと、材質が柔軟であるために、変形等によりパターンが崩れてしまう等の問題点が挙げられる。PDMS の親水性を向上させる工夫は幾つか報告されており、酸素プラズマ処理や PDMS 表面へのアルカンチオール修飾などが行われている³³⁾³⁴⁾。また、接着タンパク質の吸着法の検討も行われており、基板とタンパク質との間にクロスリンカーを挟む固定化法が提案されている²⁶⁾²⁷⁾³⁵⁾³⁶⁾。

2・1・2 Microfluidic patterning 本法では、フォトレジストを鋳型にラインパターンを作製した PDMS を、基板上にかぶせることで微小流路を作製する。この流路内に溶液を流し込み、細胞接着性タンパク質を吸着させることで、基板上にライン状のパターンが作製できる^{37)~39)}。Patel らは、微小流路を用い、アビジン-ビオチン結合を介して RGD ペプチド (Arg-Gly-Asp) と PEG を固定化することにより細胞をパターン培養した⁴⁰⁾。ビオチン修飾した polylactide-PEG (PLA-PEG-biotin) の薄膜上に PDMS 流路を設置し、微小流路を通してアビジンを固定化する。これにより微小流路に対応したアビジンのパターンができ、ビオチン修飾 RGD ペプチドを添加することで RGD ペプチドのパターンが得られる。本手法によりウシ血管内皮細胞及び PC-12 細胞のパターニングに成功している。

Folch らは、PDMS 微小流路を用いて ECM タンパク質

のパターンを作製することで、細胞のパターン培養を行っている⁴¹⁾⁴²⁾。更に PDMS を取り除いた後、パターン外の領域に線維芽細胞等の強い接着性を有する細胞を添加することで、共培養が達成できる。また、3 次元の微小流路による細胞パターニングも検討されており、より複雑なパターンの作製を可能としている⁴³⁾。

2・1・3 Laminar flow patterning PDMS による流路を用いたパターニング手法に、層流を利用した方法がある⁴⁴⁾⁴⁵⁾。数本の層流を合わせて一つの流れにすると、各々が混ざることなく平行な流れができる (Fig. 2)。したがって、基板上に数種類のパターニングが作製可能であり、異種細胞の同一基板上でのパターン培養が可能となる⁴⁴⁾⁴⁵⁾。また、溶液の制御が可能であるため、パターニングされた細胞への局所的な刺激が可能となる。心筋細胞のネットワークに微小流体デバイスを組み込むことで、細胞パターン局所への薬剤投与に成功している³²⁾。また、細胞サイズ以下の層流を組み合わせることで、単一細胞レベルでの局所投与が可能であり、同一細胞内に異なる蛍光色素や試薬を投与できる⁴⁶⁾。

2・1・4 Stencil patterning 基板に細孔を作製したステンシルを用いて細胞のパターニングを行う手法がある。金属のステンシルを用いたパターン培養は古くから行われてきたが⁴⁷⁾⁴⁸⁾、基板との密着性が悪く、またマイクロメートルサイズの微細加工が難しい等の問題を有していた。そこで、ソフトリソグラフィーを用いたステンシルの利用が提案された⁴⁹⁾。PDMS により作製したステンシルを培養基板上に設置し、細胞を添加して培養を行う。その後、ステンシルを取り外すことで、ステンシルの細孔に対応した細胞のパターンが得られる。本手法は、接着タンパク質等の処理を要せず、接着性の細胞であれば細胞の種類にかかわらず利用可能である。また、ステンシルを用いた ECM タンパク質のパターニングも検討されている⁵⁰⁾。ステンシルの細孔に対応した ECM タンパク質のパターンを作製後、他の領域を BSA (bovine serum albumin) 等でブロッキングして培養を行うことで細胞のパターン培養が可能となる。

2・2 電気化学リソグラフィーによるパターニング

Nishizawa らは、アルブミン固定化基板の細胞接着特性を電気化学反応により改質することで、細胞のパターニングに成功した⁵¹⁾。細胞非接着性タンパク質であるアルブミンを固定化した基板表面に、マイクロ電極を近接させ、活性ハロゲン種を発生させると、その部分の基板表面が細胞接着性となる (Fig. 3)。KBr を含む緩衝溶液中で 1.7 V vs. Ag/AgCl の電圧を印加すると、電極表面で次亜臭素酸が生成し基板表面の特性を改質する⁵²⁾。基板表面の改質領域は、電極の走査速度により制御可能であり、単一細胞レベルでのパターニングが可能であった。本手法は、フォトリ

Fig. 3 Scheme for localized treatment of an albumin-adsorbed substrate by the oxidizing agent electrogenerated at the microelectrode, resulting in an area-selective cell adhesion (Ref. 51-Copyright American Chemical Society)

ソグラフィ・ソフトリソグラフィのプロセスが不要で、迅速かつ簡便なパターンニングが可能となる。また、事前に細胞がパターンニングされた基板表面にも適用可能であるため、複数種の細胞によるパターンを作製可能となる。更に凹凸を有する3次元構造物表面にも適用可能であるため、各種デバイスへの細胞集積化技術としての有効性が示唆される。

2.3 誘電泳動法によるパターンニング

個々の細胞を操作可能な誘電泳動を用いた細胞パターンニングが検討されている。誘電泳動は、誘電泳動現象を利用して細胞操作を行う手法である^{53)~57)}。誘電泳動力は、不均一電場中に置かれた誘導体に作用する力であり、誘起双極子と電場の相互作用によって生じる。細胞を不均一な交流電場に置くと、個々の細胞には以下に示す誘電泳動力(F)が作用する。

$$F = 2\pi a^3 \operatorname{Re}(\epsilon_s) \operatorname{Re}(K) \operatorname{grad}(E^2)$$

$$K = (\epsilon_{\text{cell}} - \epsilon_s) / (\epsilon_{\text{cell}} + 2\epsilon_s)$$

ここで、 a は細胞の半径、 ϵ_{cell} 、 ϵ_s は細胞及び溶媒の複素誘電率、 Re は複素数の実数部を表す。細胞に働く誘電泳動力は、細胞サイズと電場の不均一性に支配され、細胞の働く方向は関数 K の実数部の符号に左右される。加えた交流の周波数がMHz領域では $\operatorname{Re}(K)$ は正となり、細胞は電気力線が集中する電極に移動する。一方、kHz領域では $\operatorname{Re}(K)$ は負となり、細胞は電場の弱い方向に移動する。このように、印加周波数により細胞の動きを制御できる。

誘電泳動力を利用すると、固相基板上への細胞パターンニングが可能となる。細胞懸濁液を目的の基板と、パターンニングの鋳型となるマイクロアレイ電極で挟み、電極に細胞が反発する周波数(10 kHz 近辺)の交流を印加すると、細胞は電極から反発を受け、電気力線が疎である方向へと移動

する。その結果、細胞は電極の真下の位置にあたる基板上へ、電極のパターンどおりに並ぶ⁵⁸⁾。本手法はパターンニング基板への前処理を一切要せず、あらゆる平面上へのパターンニングが可能である。更にパターン作製に培養工程を必要としないため、細胞の接着特性にかかわらず、しかも瞬時にパターンが作製できる。また、一度作製した電極は鋳型として何度でも使用できるため、同じパターンを容易に複製できる。

最近、ソフトリソグラフィーを利用した、誘電泳動によるパターンニングが報告された⁵⁹⁾。マイクロアレイ電極上(3 μm 径)にフィブロネクチンのパターンを作製し、細胞を誘引する周波数(2 MHz)を印加することで、細胞数を制御したパターン培養が検討された。その結果、各電極に1個の細胞が捕そくされ、フィブロネクチンのパターン領域内において細胞数を制御可能であった。通常のパターンニング培養においては、接着タンパク質の領域、及び細胞懸濁液の濃度によって細胞数を制御しているが、本手法を用いることでパターン化領域に任意の細胞数を培養可能となる。

2.4 細胞パターンニングを用いた細胞機能評価

細胞は、細胞外マトリックスや周囲の細胞と結合し、相互作用することで機能を発現している。このような細胞機能の評価にマイクロパターンニング技術が利用されている^{7)~10)}。肝実質細胞は、通常の単層培養では数日程度で分化機能を失うため、*in vitro*での機能評価が非常に困難である⁶⁰⁾。そのため、*in vitro*での肝機能の維持を目的とした研究が盛んに検討されている。肝実質細胞を線維芽細胞と共培養することで、肝機能を長期間維持可能である^{61)~63)}。フォトリソグラフィーを用いて肝実質細胞をパターン化した後、線維芽細胞を添加して培養を行うことで、パターン化共培養による細胞機能評価が検討された。その結果、肝細胞のアルブミン及び尿素合成能が2週間程度維持されており、線維芽細胞との細胞間接触を通して、肝細胞の分化形質が維持されることが示唆された。また、温度応答性ポリマーである*N*-イソプロピルアクリルアミドを用いて肝実質細胞と内皮細胞との共培養が検討されており、2か月以上にわたって肝細胞本来の機能を維持可能であることが報告されている⁶⁴⁾⁶⁵⁾。

ソフトリソグラフィー技術により、細胞接着の領域を単一細胞レベルで制御可能になった。パターンニング技術により細胞形状を任意に制御し、細胞活性、分化機能やタンパク質分泌量への影響が検討されている。Ingberらは、 μCP 法を用いて肝実質細胞の形状を制御し、DNA及びアルブミンの合成能を評価した⁶⁶⁾。その結果、DNA合成能は、細胞接着領域が広いほど高く、パターン化されていない細胞が最も高い合成能を示した。これは、接着領域を制限す

Fig. 4 The cell biology of extracellular acidification
Upon receptor stimulation, signal transduction pathways are induced. The corresponding ATP consumption is compensated by the increased uptake and metabolism of glucose, which results in an increase in the excretion of acid waste products. The extracellular acidification can be measured by field-effect sensor (e.g., LAPS or ISFET)

ること細胞周期が変化していることを示唆している。一方、アルブミン合成能は、接着領域を小さく制限するほど合成能が高く、また時間経過に伴う合成能の低下も少なかった。アルブミン合成は、肝特異的機能であり、合成能の維持は肝細胞の機能維持を意味する。したがって、細胞接着領域を制限するほど細胞増殖が抑制される一方、分化形質は維持されることが示唆された。同様に、細胞接着領域を制限することで、血管内皮細胞の分化機能を制御可能であることが報告されている⁶⁷⁾。細胞接着領域を 10 μm のライン状にパターン化して培養を行うと、細胞増殖、アポトーシス共に抑制され、細胞ラインの中央に管の形成が認められた。一方、30 μm 以上のライン幅でパターン化を行うと、管の形成は認められなかった。したがって、接着領域の制御により分化機能の制御が可能であることが示された。血管内皮細胞による血管新生機能は、様々な疾病に関与しており、特にがん治療における標的として注目されている⁶⁸⁾⁶⁹⁾。パターン化培養による *in vitro* での細胞機能の構築は、このような薬剤スクリーニング等への応用が期待される。

細胞形状だけでなく、細胞間の接着による細胞周期の変化が μCP 法を用いて評価されており、細胞間の接着が増殖を促進することが報告されている⁷⁰⁾⁷¹⁾。細胞間の情報伝達（コミュニケーション）の評価においても、アストロサ

イト⁷²⁾や心筋細胞^{30)~32)}を対象として、パターン化培養技術が利用されている。以上のように、細胞のパターン化培養技術は、細胞接着や細胞形状をマイクロメートル単位で制御可能であり、更に細胞間相互作用の評価や異種細胞の共培養を可能とする。今後、バイオセンサーや再生医学などの様々な分野への応用が期待される。

3 細胞チップによる細胞活性モニタリング

細胞を培養したまま pH、酸素濃度、インピーダンスなどを無侵襲的にリアルタイムで計測するシステムについて紹介する。本節では、主に microphysiometer と cell monitoring system (CMS) について紹介するが、これらは少量の試料 ($10^4 \sim 10^6$ cells) で、細胞応答を評価可能である。近年の培養技術及び半導体微細加工技術を駆使した新しいモニタリングシステムとして、センサー開発に携わる研究者側からのアプローチのみならず、細胞生物学分野の研究ツールとして、リガンド-レセプター相互作用や薬剤スクリーニングへの実用的応用研究が報告されている。また、3 次元培養細胞チップシステムとして、著者らの研究も踏まえ、微小試料量 (300 cells 程度) で、より生体内本来に近い条件下での細胞特性を評価した研究も紹介する。

3.1 Microphysiometer による細胞外酸性化速度評価法

Microphysiometer は、細胞培養とその機能評価を同時に行うシステムとして考案された⁷³⁾⁷⁴⁾。類似のシステムとして PAB (potentiometric altering biosensor system) や Cytosensor (ドイツ Molecular Device 社製の市販品) など様々な呼称があるが、本節で紹介する細胞チップの検出部はすべて LAPS (light-addressable potentiometric sensor)^{74)~76)} という半導体素子を採用している。

3.1.1 Microphysiometer の構成 Microphysiometer の構造は、Fig. 4 に示すように、細胞培養部と pH 検出部 (LAPS) に分けられる⁷⁴⁾⁷⁹⁾。細胞の培養は、polycarbonate で囲まれた培養領域 (容積 2.8 μl) に培養液を導入しながら行う。LAPS はシリコン基板を絶縁膜 (SiO_2 , Si_3N_4) で被覆した半導体デバイスであり^{76)~78)}、基板の裏面から赤外発光ダイオード (LED) を照射する。絶縁膜の表面電位依存的に生ずる光電流を電圧に変換し出力する。このとき、変化 1 pH に対して、およそ 60 mV の電圧変化が得られる⁸⁰⁾⁸¹⁾。また、非接着性の細胞や菌類を対象とする場合は、低融点寒天に包埋してポリカーボネート製膜に挟み込むようにして LAPS 検出面に設置する⁸²⁾⁸³⁾。LAPS では赤外光が照射された領域のみの pH を感応するので、光源レーザーを走査したり⁸⁴⁾⁸⁵⁾、LED を複数用いる⁷⁶⁾⁸⁶⁾⁸⁷⁾ ことにより、pH イメージングや局所 pH の同時評価装置が開発されている。このような、同一基板上での複数種の評価は、共培養系への応用性が示唆されており、より生体内を反映

Fig. 5 Schematic diagram of microphysiometer

した評価法の確立が期待される。

3.1.2 細胞外酸性化速度 細胞外酸性化速度 (EAR, extracellular acidification rate) は主に代謝活性上昇に伴う細胞外 pH の低下を表すパラメーターであり、有用な細胞活性の指標として認知されつつある。細胞外 pH 変化は、ATP (adenosine triphosphate) の加水分解と共役して起こるプロトンの放出 (Na^+/H^+ exchanger などの輸送タンパク質が関与)、二酸化炭素 (炭酸イオン) や乳酸の排出などに起因し、解糖系や TCA (tri-carboxylic acid) 回路、呼吸電子伝達鎖などのエネルギー産生経路と密接にかかわっている (Fig. 5)。更に、細胞表面における種々のリガンド-レセプター結合が、エネルギー産生経路を制御する。細胞表面受容体 (レセプター) は、G タンパク質共役型、イオンチャンネル型、チロシンキナーゼ結合型などが存在し、各々の受容体をターゲットとする薬理応答・情報伝達機構が LAPS により計測できる⁸¹⁾⁸⁸⁾。特にホルモンや細胞増殖因子の投与に対し、解糖系代謝経路の活性化に伴う pH 低下を追跡した研究例が多く報告されている。動物細胞では通常 1 秒間に 10^8 程度のプロトンを放出するが、種々のリガンド-レセプター結合によりプロトン放出量が 10~100% 増加する⁸¹⁾。

Microphysiometer は、薬剤スクリーニングのツールとしても利用されている。EAR により薬剤添加に対する細胞活性変化をモニタリングする。これまでに、がん細胞株^{89)~91)}や肝細胞^{91)~94)}を用いた薬剤感受性評価が行われている。がん細胞においては薬剤の抗がん効果を見積もる目的で、肝細胞においては薬剤の及ぼす細胞毒性を評価する

目的で使用されている。このようなスクリーニングシステムは動物代替法としての利用が期待されており、近年、がん患者より摘出したしゅよう (腫瘍) 組織を対象とし、抗がん剤感受性試験への応用が検討されている。これについては、後で詳しく述べる。

3.2 Cell monitoring system による多項目細胞機能モニタリング

CMS (cell monitoring system) は、複数のマイクロセンサーを集積化したチップを構築し、微量の細胞試料を対象とし、多項目機能情報の取得を目指すシステムである^{95)~100)}。前節の microphysiometer と同様、細胞培養系とマイクロセンサーを組み合わせたシステムで構成されるが、複数のマイクロセンサーが集積化された様々なデザインの細胞チップが設計されており、より複合的な細胞機能情報の取得を目指している。典型的な CMS の構成として Fig. 6 では、3 種類のセンサー (と温度計) を内蔵する¹⁰¹⁾。pH センサーである ISFET (ion sensitive field effect transistor)、 O_2 センサー、及びインピーダンスセンサーである IDES (interdigitated electron structures) が集積化されている。このセンサーチップ上で細胞を培養し (Fig. 6 円の領域)、3 種のパラメーターを同時モニタリングすることにより薬剤感受性の評価を行う。以下では、各センサー及び CMS の研究例を紹介する。

3.2.1 ISFET 溶液の pH を測定するセンサーとして、1970 年 Bergveld によって ISFET の原理が発表されて以来¹⁰²⁾、多くのセンサーが開発されている^{103)~105)}。Fig. 7

Fig. 6 (A) Schematic view of a glass chip. (B) Example of an experimental setup with two chambers each containing a glass chip

The tubing for providing and removing the culture medium to the chambers and the electrical connections are schematically indicated (Ref. 101-Reproduced by permission of ELSEVIA)

Fig. 7 Structure of an ISFET

RE: reference electrode; V_G: gate voltage; V_{DS}: drain-source voltage; I_D: drain current (Ref. 104-Reproduced by permission of The Royal Society of Chemistry)

に ISFET の基本構造を示す。測定原理は LAPS と同様にシリコン基板上の絶縁膜の表面電位が pH 依存的に変化すること起因する。参照極にバイアスをかけて FET (field effect transistor) のチャンネルを導通状態にし、ゲート絶縁膜表面に発生する電圧変化をチャンネルコンダクタンスの変化として検出する。ゲート絶縁膜表面にイオン感応材料を薄膜状に固定化することにより、種々のイオンセンサーが作製できる¹⁰³⁾。ISFET は集積が容易であることから、集積化チップへの応用が検討されている^{95)~100)}^{106)~111)}。12 個の ISFET とインピーダンスセンサー (IDES) を集積化したチップにより、細胞応答モニタリングのオートメーション化が検討された¹⁰⁸⁾¹⁰⁹⁾。ISFET の絶縁膜上に酸素センサーとしてパラジウム電極を集積化することにより、同一の細胞を対象とする酸素消費と pH 変化の同時測定が報告されている¹¹¹⁾。

ISFET では、pH のみならず細胞外電位の測定が可能であり、1970 年代から筋繊維¹¹²⁾や神経組織¹¹³⁾に対して、また近年、無せきつい神経¹¹⁴⁾、せきつい神経¹¹⁵⁾、心筋細胞¹¹⁶⁾を対象に実施されている¹⁰⁴⁾¹¹⁷⁾。神経細胞や心筋細胞

Fig. 8 Schematic of cellular impedance system for monitoring morphological changes and motility of adherent cells (Ref. 141-Reproduced by permission of Nature Publishing Group)

のように活動電位を発生する細胞においては、センサーのゲート上に細胞を接着させることで、細胞-シリコン結合がFETとして機能し、細胞の活動電位の変化を検出可能となる⁽¹¹⁴⁾⁽¹¹⁸⁾。シリコン基板を介した刺激印加⁽¹¹⁹⁾、同一基板上に刺激印加部位とISFETを集積化したチップ⁽¹²⁰⁾が報告されている。このように、ISFETを用いることで、個々の細胞の活動電位を長時間測定可能となり、更にチップ上への集積化が容易であるため、はん用性が高い。最近では、ISFET上への神経細胞のパターニングによる微小ネットワークの構築が検討されている^{(121)~(124)}。

3・2・2 O₂ sensor 1956年にClarkにより酸素電極が報告されて以来、多くのセンサーが考案され、実用に至っている⁽¹²⁵⁾。クラーク型酸素電極は、作用極(Pt)と対極(Ag/AgCl)が一体化されており、作用極の表面がテフロンやポリエチレンといったガス透過膜で覆われた構造を有する。測定原理は、O₂還元拡散限界電流(約-0.6 V)を測定する定電位アンペロメトリーに属する(電流を検出)。酸素電極は、細胞の酸素消費量の測定や血中酸素分圧測定、バイオセンサーのトランスデューサーとして利用されている。近年、酸素センサーの微小化、集積化が検討されている^{(126)~(130)}。平面基板上への微小電極の作製は、 μ TAS等への応用が展開されており、多種センサーの集積化を可能とする。CMSチップにおいては、30 μ m径のパラジウム電極を作用極として用いており、参照極及び対極の3電極が集積化されている⁽¹⁰⁰⁾。しかしながら、このような集積化酸素センサーにおいては、電極表面の汚染による電極活性の低下やデバイスの有効期間が短い等の問題点も報告されている⁽¹³¹⁾。

3・2・3 Impedance sensor GiaeverとKeeseにより、細胞移動をリアルタイムでモニターする手法としてインピーダンスセンサーが開発された⁽¹³²⁾⁽¹³³⁾。測定は金電極を用いて行い、金電極に交流電場を印加した際のインピーダンスの値から細胞移動を評価する(Fig. 8)。金電極上で細

胞を培養すると、電極上に細胞が接着し伸展した形態をとる。電極上に細胞が接着すると、細胞膜の電気抵抗成分及び電気容量成分が加算されてインピーダンスが増加する。したがって、インピーダンスの変化から、電極上の細胞接着領域⁽¹³⁴⁾⁽¹³⁵⁾をモニターできる。本手法は、非侵襲測定であることから、長時間のリアルタイムモニタリングが可能で、細胞毒性試験等にも利用されている^{(136)~(139)}。

細胞移動計測においては、1 nm単位での移動を計測可能であり、光学顕微鏡計測よりも優れた分解能を有している⁽¹⁴⁰⁾⁽¹⁴¹⁾。この特徴を生かし、細胞機能評価への応用が検討されている。血管内皮細胞を用いた測定では、内皮のバリア機能評価⁽¹⁴²⁾やNOによる細胞移動の評価⁽¹⁴³⁾、がん細胞の内皮細胞間への浸潤能評価が行われている⁽¹⁴⁴⁾。また、線維芽細胞を用いて、微小な細胞形状変化のモニタリングが行われている⁽¹⁴⁵⁾。Wolfらは、くし型のPt電極を用いてインピーダンス測定を行うIDESを作製し、4日間程度の長期間モニタリングにより、薬剤感受性評価を行っている⁽¹⁴⁶⁾⁽¹⁴⁷⁾。細胞応答をリアルタイムでモニター可能であることから、時間と濃度に依存した薬剤感受性の評価が可能であり、薬剤スクリーニングシステムとしての有効性を示している。本システムの検出部は5×5 mm²であり、CMSチップにそのまま搭載されている。

3・2・4 多項目モニタリング CMSには以上の3種類のセンサーが集積化されている。3センサー共に非侵襲法であるため、細胞応答のリアルタイムモニタリングが可能となる。CMSを用いた抗がん剤添加における細胞応答のリアルタイムモニタリングが報告されている⁽¹⁴⁸⁾。測定対象はマウスがん細胞株、薬剤には抗がん剤doxorubicin(DOX)を用いている。測定の際は、終了時に界面活性剤を添加して細胞を死滅させ、その時の応答を基準とし、pH、酸素消費及びインピーダンス測定に基づくキャパシタンス変化のモニタリングが行われた(キャパシタンスは細胞接着領域が広いほど値が減少する)。pH及び酸素消費量では、薬剤を添加していない場合では時間経過に伴い増加しているのに対し、DOX添加時では数時間後から減少が認められた。一方、キャパシタンスにおいては、薬剤の有無によらず測定開始後1日程度では、細胞の接着・伸展に伴う減少が認められた。その後、DOXによるキャパシタンスの変化が認められ、添加後4日には細胞活性が完全に消失した。このように、同一基板上で3種類の細胞応答をリアルタイムでモニターすることに成功しており、薬剤添加における応答の変化を評価可能である。現在、更なる小型化が検討されており、細胞培養領域(Fig. 6円の領域)を10 mm²以下に小型化することが想定されている⁽¹⁰⁰⁾。

Fig. 9 Principle of the SECM-based viability assay using collagen-cell mixture embedded in silicon substrate (Ref. 177-Copyright American Chemical Society)

3・3 3次元培養細胞チップ評価システム

3・3・1 細胞外マトリックスと3次元培養法 細胞を細胞外マトリックス (ECM) に包埋して培養を行う3次元培養は, 細胞機能を生体内類似の環境下で培養可能であり, 近年注目されている^{149)~151)}. 通常, 細胞は生体内で3次元構造を形成し, 極性を保持していることが知られている. このような細胞機能を3次元培養により *in vitro* において再現可能であることが報告されている^{152)~156)}. 中でも, 1997年に Bissell らによって, がん細胞を3次元培養下で $\beta 1$ -integrin 抗体で処理することで極性を持たせ, がん細胞としての機能を阻害可能であることが報告されて以来, がん研究において注目されている^{157)~159)}. このような機能は, 2次元培養では認められず, 3次元培養の重要性が示唆されている.

ECM には, コラーゲン・ゲル及び matrigel が広く利用されている. matrigel はマウス肉しゅより抽出された基底膜調整品であり, ラミニンを多く含む¹⁶⁰⁾¹⁶¹⁾. 細胞の極性を保持するためには, ラミニンが必要であることが報告されており¹⁵⁹⁾, このような研究には matrigel がよく利用される. 一方, コラーゲンは1930年代より細胞培養への利用が検討されており, 細胞機能の発現・維持を目的として多くの研究が報告されている^{162)~165)}. コラーゲンは, 体内の全タンパク質の3分の1を占めており, 細胞を物理的に支持する基質 (マトリックス) の役割を担っている. 3次元培養への利用は1960年代から検討され, 1979年 Nandi らによりコラーゲンゲル包埋培養法が報告された^{165)~168)}. コラーゲンに包埋した細胞は, 固有の形態学的性質と機能を維持可能である^{165)~169)}. コラーゲンは matrigel に比べて安価ではん用性に優れている. 細胞の薬剤感受性試験法としてコラーゲンゲル包埋培養が適用され, 高い *in vivo* 相関性が得られている^{170)~173)}. また, コ

ラーゲンゲル包埋培養を用いることで, 摘出組織から単離した細胞の培養成功率が向上することが報告されている¹⁶⁵⁾¹⁷⁴⁾.

3・3・2 マイクロ3次元培養における細胞活性評価システム このような細胞外マトリックスによる3次元培養の特徴を生かした細胞チップへの応用はあまり報告されていない⁴⁹⁾¹⁷⁵⁾¹⁷⁶⁾. 著者らは, 細胞の支持体としてコラーゲンを用いた細胞チップを開発し, 薬剤感受性試験への応用を検討してきた¹⁷⁷⁾. チップ基板には, 微細溝を作製したシリコンを用い, 細胞-コラーゲン混合液を固定化することで細胞チップを作製した. 微細溝の体積はおよそ18 nl であり, 微細溝当たりの細胞数はおよそ300個程度である. この微細溝内で, 10倍程度まで細胞の増殖が可能であるため, 1週間程度の測定が可能となる¹⁷⁸⁾.

測定は, 走査型電気化学顕微鏡 (SECM, scanning electrochemical microscopy) を用い, 細胞の酸素消費量を指標として行う (Fig. 9). SECM 計測は, 探針に数ミクロン径のマイクロ電極を用いることで, 単一細胞レベルでの測定が可能であり, 細胞活性評価への応用が検討されている. これまでに, 細胞の酸素消費量^{179)~184)}や光合成活性¹⁸⁵⁾, 酸化還元活性^{185)~187)}などの評価に応用されている. 著者らは, 経時的に酸素消費量を測定することで, 細胞の増殖挙動モニタリングへの応用を試みた.

Fig. 10 に薬剤感受性評価の結果を示す. 薬剤には抗がん剤である adriamycin (ADM) を用いた. (a) に示す写真の左側が ADM に対して感受性を示す細胞 (K562), 右側が耐性を示す細胞 (K562/ADM) であり, この両細胞が同一基板上に固定化されている. ADM 添加前 (b) においては, 両細胞共に同程度の活性を有しているが, 添加後3日 (c) においては, 耐性細胞の活性が大きいことが分かる. また, 添加前後 (b, c) を比べると, 耐性細胞のみ活性が増加しており, 増殖を続けていることが分かる. このように, 異種細胞の同一基板上での培養及び薬剤感受性の経時変化をモニターすることに成功した. また, ADM を添加せずに, 両細胞の活性をモニターした結果, 指数関数的な活性の増加が認められ, チップ上に固定化した細胞が, 正常に増殖していることが示唆された. このように, 本手法を用いることで, 3次元培養環境下での細胞増殖挙動をモニタリング可能となる.

4 細胞チップを用いた抗がん剤感受性試験への応用

がん化学療法において, 抗がん剤の効果は患者により異なるため, 個々の患者の抗がん剤感受性を知ることは重要である. 化学療法前に感受性試験により患者に合った有効な薬剤を選択することで, 副作用の軽減等に基づく QOL (quality of life) の向上が期待される. 1977年に Hamberger と Salmon により, 試験管内において生体内

Fig. 10 (a) Optical micrograph of collagen-cell matrix integrated on silicon microstructure. (b, c) SECM images of the cell chip before (a) and 3 days after (b) exposure to a medium containing 1 mM ADM. Bar is 200 mm (Ref. 177-Copyright American Chemical Society)

のがん細胞のみを増殖させ、抗がん剤の感受性を評価可能であることが報告され、抗がん剤感受性試験が広く臨床に適用されるようになった¹⁸⁸⁾。以来、これまでに多くの試験法が開発されており、臨床においてもその効果が示されている^{174)189)~191)}。

4.1 現行の抗がん剤感受性試験と課題

現在、最も利用されている手法は比色測定系〔SDI (succinic dehydrogenase inhibition) 法, MTT {3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide} 法など〕であり、細胞内の脱水素酵素の活性を指標とし、基質であるテトラゾリウム塩を添加した際の吸光度により評価を行う^{189)192)~194)}。本手法は、安価で簡便であるため広く臨床に適用されている。しかし、初代培養の成功率が低いことや、間質の線維芽細胞の混入による過小評価が指摘されている¹⁹⁵⁾。しかしながら、簡便性に優れており、1次スクリーニングとしての利用や無効な薬剤の選択には非常に有効である。

2番目に利用されている手法は、コラーゲンゲル包埋培養を用いたCD-DST法 (collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test) である^{170)~174)}。本手法は、ニュートラルレッドにより生細胞を染色し、画像解析定量法を用いて評価を行う。薬剤接触は、臨床における血中濃度・時間曲線下面積 (AUC, area under the curve) に近い条件で行い、この後7日間の培養による増殖量により評価を行う。また、無血清培地を用いて培養を行うことで線維芽細胞の増殖を抑制し、画像解析により腫瘍細胞のみを評価可能とした。本手法は、少量の試料で評価可能であり、高い臨床予測率が報告されている。

3番目に、コラーゲンマトリックスを用いた組織培養法とテトラゾリウム塩であるMTTによる評価法を組み合わせたHDRA (histoculture drug response assay) が利用されている¹⁹⁰⁾¹⁹⁶⁾¹⁹⁷⁾。本手法は、腫瘍組織をそのまま用いている点に特徴がある。1 cm 角のコラーゲンゲル上に細切した腫瘍組織を静置し、抗がん剤を添加して7日間の培養を行う。その後、MTT 試薬とコラーゲナーゼを加えて培養した後に抽出液を用いて測定を行う。このほかにも多くの評価法が開発され、臨床への応用が検討されている。1998年の制がん剤適応研究会において、抗がん剤感受性試験の臨床予測率は74% (1101例を対象)と報告されている。中でも真陰性率は93%に上り、無効な薬剤の選択には非常に有効であることが示されている。また、真陰性率は46.6%であり、感受性試験により選択された薬剤の半分近くが有用であることが示されている。しかし、得られる試料が少量であることや培養成功率が低いこと、操作が煩雑であること等の理由から、いまだ実用には至っていない。そこで、少量の試料によって迅速かつ簡便に評価可能なシステムの構築を目的として、細胞チップを用いた抗がん剤感受性試験法の開発が検討されている。

4.2 細胞チップによる抗がん剤感受性試験

4.2.1 Microphysiometer による抗がん剤感受性試験

1998年 microphysiometer を用いて抗がん剤感受性評価が試みられた¹⁹⁸⁾。作用の異なる8種類の抗がん剤を用い、20時間のpHモニタリングが行われた。薬剤濃度は72時間後に生細胞数が10%以下になる濃度に設定され、fluorescein diacetate による蛍光評価との比較により検討が行われた。その結果、薬剤効果に起因するpH変化が認められ、更に6種類の薬剤においては、蛍光評価との相関が認められた。本手法は、抗がん剤を含む培養液を流しながら培養を行っており、通常のdishによる培養とは条件が異なる。相関の得られなかった2種薬剤に関しては、培養条件の違いに起因することを示唆しており、flow系である本手法がより生態環境に近く、有効な手法であることを提案している。更に一般的な手法であるMTT法との比

Fig. 11 (a) A flow diagram of the study. (b) Proliferation rate of HL-60 cells under various cultivation conditions (Ref. 178-Reproduced by permission of Wiley-Liss)

較が検討され、pH による評価法が高感度であり、短時間での評価が可能であることが示唆された¹⁹⁹⁾。このように、細胞の代謝活性を指標とすることで、抗がん剤の効果を短時間で評価可能であることが示された。近年、がん患者より摘出した腫瘍組織を用いた感受性評価が検討されている²⁰⁰⁾。摘出された細胞は、株化細胞に比べて活性が低いことが知られているが、microphysiometer を用いて pH 変化を評価可能であることが示された。更に臨床との相関が検討されており、薬剤が無効と評価された 18 人に対して化学治療が行われた結果、すべての人に効果が認められなかった。このように、microphysiometer による評価法が有効であることが示唆された。本手法は、少量の試料 ($\sim 10^5$ cells) で短時間 (~ 20 時間) での評価可能である点に特徴がある。現在、更なる臨床試験が試みられている。同様に、CMS を用いた感受性評価も検討されている¹⁰¹⁾¹⁴⁸⁾。Fig. 6 に示すように、抗がん剤に対する 3 種類の細胞応答を同時にモニター可能となり、臨床への応用が期待できる。また、摘出細胞を用いても評価可能であることが示唆されており、現在、更なる検討が試みられている¹⁰⁰⁾。

4・2・2 SECM による抗がん剤感受性試験 このように、細胞チップを用いた評価法は、少量の試料で短時間で

の評価が可能であり、更にチップ上への集積化による多機能化への応用が可能である。また、測定の自動化が検討されており、臨床への応用が期待できる。しかしながら、いずれの研究例においても、採用されている薬剤濃度が最大血中濃度よりも高く、生体内投与許容量を想定していない。そのため、無効な薬剤の選択には有用であるが、有効性の判定には問題がある。更に初代培養の成功率や線維芽細胞の混入等の問題点を含んでいる。そこで著者らは、3 次元培養細胞チップを用いて抗がん剤感受性評価への応用を検討してきた¹⁷⁸⁾。摘出細胞による評価を考慮して、マウス摘出細胞による評価を試みた (Fig. 11a)。マウスには免疫不全マウスである SCID (severe combined immunodeficiency) マウスを用い、ヒトがん細胞株を移植後、腫瘍を摘出して評価を行った。まず、摘出細胞の増殖挙動のモニタリングを行った (Fig. 11b)。その結果、腫瘍を摘出後、通常のフラスコにおける培養では、細胞の増殖速度が急激に増加したのに対し、チップ上でのコラーゲン包埋培養においては、マウス皮下における増殖速度を維持していることが分かった。したがって、本手法により生体内における細胞の増殖挙動を再現可能となる。次に、抗がん剤感受性評価を試みた。抗がん剤の接触条件は、CD-DST 法と同様に行い、体内の薬理動態的に等価な接触条件であ

る, 最大血中濃度の 1/10 の濃度で 24 時間接触により行った。その結果, 抗がん剤の効果に起因する細胞の増殖挙動をモニターでき, 4 日程度での評価が可能であることが分かった。また, 抗がん剤添加後, 2 日程度では, 薬剤による増殖挙動の差がほとんど生じておらず, 評価までには 4 日程度が必要であることが示唆された。このように, 本手法により抗がん剤の効果に起因する細胞の増殖挙動がモニター可能となり, 抗がん剤感受性試験としての有効性が示唆された。本手法は, 細胞の支持体にコラーゲンを用い, 体内に等価な薬剤接触を行うことで, より生体内に近い環境での評価が可能である点に特徴がある。現在, がん患者より摘出した腫瘍組織による感受性評価を検討中である。

以上のように, 細胞チップを用いた感受性評価法は, 少量の試料で短期間での評価が可能である。更にハイスループット化や自動評価システムへの可能性を有しており, 臨床への応用が期待される。今後, 細胞チップの研究及び細胞培養技術が進歩することで, 抗がん剤感受性試験が医療における検査として利用されることが期待される。

5 おわりに

細胞チップを用いたバイオアッセイに関して, 細胞集積化技術とアッセイ法を中心に紹介した。細胞のパターン培養及び 3 次元培養技術は, 細胞の分化機能や極性機能を制御可能とする手法であり, *in vitro* において生体組織の再構築が期待されている。このような生体組織の再構築は, 基礎生物学や組織培養工学への波及効果に加え, スクリーニング系における臨床予見性の向上が期待できる。また, 細胞及びセンサーの集積化により, 迅速かつ簡便なシステムの構築が期待でき, 更にハイスループット化への応用を可能とする。このような, 細胞チップによる評価法は, 薬剤スクリーニングや環境モニタリング, テーラーメイド医療といった幅広い利用が示唆されており, 将来, 簡易型の診断システムとしての利用が期待される。

文 献

- 1) L. Bousse: *Sens. Actuators B*, **34**, 270 (1996).
- 2) J. J. Pancrazio, J. P. Wheland, D. A. Borkholder, W. Ma, D. A. Stenger: *Ann. Biomed. Eng.*, **27**, 697 (1999).
- 3) D. A. Stenger, G. W. Gross, E. W. Keefer, K. M. Shaffer, J. D. Andreadis, W. Ma, J. J. Pancrazio: *Trends Biotechnol.*, **19**, 304 (2001).
- 4) G. T. A. Kovacs: *Proc. IEEE*, **91**, 915 (2003).
- 5) P. Mitchell: *Nat. Biotechnol.*, **19**, 717 (2001).
- 6) O. E. Beske, S. Goldbard: *Drug Discov. Today*, **7**, S131 (2002).
- 7) K. Bhadriraju, C. S. Chen: *Drug Discov. Today*, **7**, 612 (2002).
- 8) T. H. Park, M. L. Shuler: *Biotechnol. Prog.*, **19**, 243 (2003).
- 9) A. Folch, M. Toner: *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 227 (2000).
- 10) J. Shim, T. F. Bersano-Begey, X. Y. Zhu, A. H. Tkaczyk, J. J. Linderman, S. Takayama: *Curr. Top. Med. Chem.*, **3**, 687 (2003).
- 11) J. A. Hammarback, S. L. Palm, L. T. Furcht, P. C. Letournerau: *J. Neurosci. Res.*, **13**, 213 (1985).
- 12) D. Kleinfeld, K. H. Kahler, P. E. Hockberger: *J. Neurosci.*, **8**, 4098 (1988).
- 13) S. Britland, P. Clark, G. Moores: *Exp. Cell Res.*, **198**, 124 (1992).
- 14) B. Lom, K. E. Healy, P. E. Hockberger: *J. Neurosci. Meth.*, **50**, 385 (1993).
- 15) J. M. Corey, B. C. Wheeler, G. J. Brewer: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **43**, 944 (1996).
- 16) K. E. Healy, C. H. Thomas, A. Rezanian, J. E. Kim, P. J. McKeown, B. Lom, P. E. Hockberger: *Biomaterials*, **17**, 195 (1996).
- 17) Y. Xia, G. M. Whitesides: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **37**, 550 (1998).
- 18) R. Kane, S. Takayama, E. Ostuni, D. E. Ingber, G. M. Whitesides: *Biomaterials*, **20**, 2363 (1999).
- 19) A. Kumar, G. M. Whitesides: *Appl. Phys. Lett.*, **273**, 347 (1993).
- 20) R. Jackman, J. Wilbur, G. M. Whitesides: *Science*, **269**, 664 (1995).
- 21) G. P. Lopez, M. W. Albers, S. L. Schreiber, R. Carroll, E. Peralta, G. M. Whitesides: *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5877 (1993).
- 22) M. Mrksich, C. S. Chen, Y. Xia, L. E. Dike, D. E. Ingber, G. M. Whitesides: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10775 (1996).
- 23) M. Mrksich, L. E. Dike, J. Tien, D. E. Ingber, G. M. Whitesides: *Exp. Cell Res.*, **235**, 305 (1997).
- 24) C. D. James, R. C. Davis, L. Kam, H. G. Craighead, M. Isaacson, J. N. Turner, W. Shain: *Langmuir*, **14**, 741 (1998).
- 25) L. Kam, W. Shain, J. N. Turner, R. Bizios: *Biomaterials*, **22**, 1049 (2001).
- 26) D. W. Branch, B. C. Wheeler, G. J. Brewer, D. E. Leckband: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **47**, 290 (2000).
- 27) M. Scholl, C. Sprossler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, A. Offenhausser: *J. Neurosci. Methods*, **104**, 65 (2000).
- 28) M. Nishizawa, K. Takoh, T. Matsue: *Langmuir*, **18**, 3645 (2002).
- 29) M. Nishizawa, A. Takahashi, H. Kaji, T. Matsue: *Chem. Lett.*, **9**, 904 (2002).
- 30) H. Kaji, K. Takoh, M. Nishizawa, T. Matsue: *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 748 (2003).
- 31) H. Kaji, Y. Takii, M. Nishizawa, T. Matsue: *Biomaterials*, **24**, 4239 (2003).
- 32) H. Kaji, M. Nishizawa, T. Matsue: *Lab. Chip*, **3**, 208 (2003).
- 33) D. W. Branch, J. M. Corey, J. A. Weyhenmeyer, G. J. Brewer, B. C. Wheeler: *Med. Biol. Eng. Comput.*, **36**, 135 (1998).
- 34) J. Hyun, A. Chilkoti: *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 6943 (2001).
- 35) B. C. Wheeler, J. M. Corey, G. J. Brewer, D. W. Branch: *J. Biomech. Eng.*, **121**, 73 (1999).
- 36) D. W. Branch, B. C. Wheeler, G. J. Brewer, D. E. Leckband: *Biomaterials*, **22**, 1035 (2001).
- 37) E. Kim, Y. N. Xia, G. M. Whitesides: *Nature*, **376**, 581 (1995).

- 38) E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, B. Michel, H. Biebuyck: *Science*, **276**, 779 (1997).
- 39) E. Delamarche, A. Bernard, H. Schmid, A. Bietsch, B. Michel, H. Biebuyck: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 500 (1998).
- 40) N. Patel, R. Padera, G. H. W. Sanders, S. M. Cannizzaro, M. C. Davies, R. Langer, C. J. Roberts, S. J. C. Tendler, P. M. Williams, K. M. Shakesheff: *FASEB J.*, **12**, 1447 (1998).
- 41) A. Folch, M. Toner: *Biotechnol. Prog.*, **14**, 388 (1998).
- 42) A. Folch, A. Ayon, O. Hurtado, M. A. Schmidt, M. Toner: *J. Biomech. Eng.*, **121**, 28 (1999).
- 43) D. T. Chiu, N. L. Jeon, S. Huang, R. S. Kane, C. J. Wargo, I. S. Choi, D. E. Ingber, G. M. Whitesides: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 2408 (2000).
- 44) S. Takayama, J. C. McDonald, E. Ostuni, M. N. Liang, P. J. A. Kenis, R. F. Ismagilov, G. M. Whitesides: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5545 (1999).
- 45) S. Takayama, E. Ostuni, X. Qian, J. C. McDonald, X. Jiang, P. LeDuc, M.-H. Wu, D. E. Ingber, G. M. Whitesides: *Adv. Mater.*, **13**, 570 (2001).
- 46) S. Takayama, E. Ostuni, P. LeDuc, K. Naruse, D. E. Ingber, G. M. Whitesides: *Nature*, **411**, 1016 (2001).
- 47) S. B. Carter: *Exp. Cell Res.*, **48**, 189 (1967).
- 48) Y. Jimbo, H. P. C. Robinson, A. Kawana: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **40**, 804 (1993).
- 49) A. Folch, B.-H. Jo, O. Hurtado, D. J. Beebe, M. Toner: *J. Biomed. Mater. Res.*, **52**, 346 (2000).
- 50) E. Ostuni, R. Kane, C. S. Chen, D. E. Ingber, G. M. Whitesides: *Langmuir*, **16**, 7811 (2000).
- 51) H. Kaji, M. Kanada, D. Oyamatsu, T. Matsue, M. Nishizawa: *Langmuir*, **20**, 16 (2004).
- 52) H. Shiku, T. Takeda, H. Yamada, T. Matsue, I. Uchida: *Anal. Chem.*, **67**, 312 (1995).
- 53) T. Matsue, N. Matsumoto, S. Koike, I. Uchida: *Biochim. Biophys. Acta*, **1157**, 332 (1993).
- 54) N. Matsumoto, T. Matsue, I. Uchida: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **34**, 199 (1994).
- 55) 末永智一, 松本伯夫, 内田 勇: 高分子, **44**, 244 (1995).
- 56) 末永智一, 安川智之, 内田 勇: 応用物理, **67**, 314 (1998).
- 57) S. Ogata, T. Yasukawa, T. Matsue: *Bioelectrochem.*, **54**, 33 (2001).
- 58) T. Matsue, N. Matsumoto, I. Uchida: *Electrochim. Acta*, **42**, 3251 (1997).
- 59) D. S. Gray, J. L. Tan, J. Voldman, C. S. Chen: *Biosens. Bioelectron.*, **19**, 771 (2004).
- 60) D. Mooney, L. Hansen, J. Vacanti, R. Langer, S. Farmer, D. Ingber: *J. Cell Physiol.*, **151**, 497 (1992).
- 61) S. N. Bhatia, M. L. Yarmush, M. Toner: *J. Biomed. Mater. Res.*, **34**, 189 (1997).
- 62) S. N. Bhatia, U. J. Balis, M. L. Yarmush, M. Toner: *Biotechnol. Prog.*, **14**, 378 (1998).
- 63) S. N. Bhatia, U. J. Balis, M. L. Yarmush, M. Toner: *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 1137 (1998).
- 64) M. Yamato, O. H. Kwon, M. Hirose, A. Kikuchi, T. Okano: *J. Biomed. Mater. Res.*, **55**, 137 (2001).
- 65) M. Yamato, C. Konno, M. Utsumi, A. Kushida, M. Hirose, A. Kikuchi, T. Okano: *Biomaterials*, **23**, 561 (2002).
- 66) R. Singhvi, A. Kumar, G. P. Lopez, G. N. Stephanopoulos, D. I. C. Wang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber: *Science*, **264**, 696 (1994).
- 67) L. E. Dike, C. S. Chen, M. Mrksich, J. Tien, G. M. Whitesides, D. E. Ingber: *In Vitro Cell Biol. Anim.*, **35**, 441 (1999).
- 68) J. Folkman: *New Engl. J. Med.*, **285**, 1182 (1971).
- 69) M. Gourley, J. S. Williamson: *Curr. Pharm. Des.*, **6**, 417 (2000).
- 70) C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber: *Science*, **276**, 1425 (1997).
- 71) C. M. Nelson, C. S. Chen: *FEBS Lett.*, **514**, 238 (2002).
- 72) H. Takano, J.-Y. Sui, M. L. Mazzanti, R. T. Doyle, P. G. Haydo, M. D. Porter: *Anal. Chem.*, **74**, 4640 (2002).
- 73) J. W. Parce, J. C. Owicki, K. M. Kercso, G. B. Sigal, H. G. Wada, V. C. Muir, L. J. Bousse, K. L. Ross, B. I. Sikic, H. M. McConnell: *Science*, **246**, 243 (1989).
- 74) H. M. McConnell, J. C. Owicki, J. W. Parce, D. L. Miller, G. T. Baxter, H. G. Wada, S. Pitchford: *Science*, **257**, 1906 (1992).
- 75) J. C. Owicki, J. W. Parce: *Biosens. Bioelectron.*, **7**, 255 (1992).
- 76) D. G. Hafeman, J. W. Parce, H. M. McConnell: *Science*, **240**, 1182 (1988).
- 77) M. Adami, M. Sartore, E. Baldini, A. Rossi, C. Nicolini: *Sens. Actuators B*, **7**, 343 (1992).
- 78) M. Adami, M. Sartore, A. Rapallo, C. Nicolini: *Sens. Actuators B*, **9**, 25 (1992).
- 79) G. T. Baxter, L. J. Bousse, T. D. Dawes, J. M. Libby, D. N. Modlin, J. C. Owicki, J. W. Parce: *Clin. Chem.*, **40**, 1800 (1994).
- 80) J. C. Owicki, L. J. Bousse, D. G. Hafeman, G. L. Kirk, J. D. Olson, H. G. Wada, J. W. Parce: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 87 (1994).
- 81) F. Hafner: *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 149 (2000).
- 82) J. D. Rabinowitz, J. F. Vacchino, C. Beeson, H. M. McConnell: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 2464 (1998).
- 83) K. M. Hahnenberger, Z.-P. Jia, L. Fliegel, P. A. Dibrov, S. M. Hemmingsen, P. G. Young: *Yeast*, **11**, S437 (1995).
- 84) M. Nakao, T. Yoshinobu, H. Iwasaki: *Sens. Actuators B*, **20**, 119 (1994).
- 85) M. Nakao, S. Inoue, T. Yoshinobu, H. Iwasaki: *Sens. Actuators B*, **34**, 234 (1996).
- 86) Z. Qintao, W. Ping, W. J. Parak, M. George, G. Zhang: *Sens. Actuators B*, **73**, 152 (2001).
- 87) B. Stein, M. George, H. E. Gaub, J. C. Behrends, W. J. Parak: *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 31 (2003).
- 88) J. C. Owicki, J. W. parce, K. M. Kercso, G. B. Sigal, V. C. Muir, J. C. Venter, C. M. Fraser, H. M. McConnell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4007 (1990).
- 89) H. G. Wada, J. C. Owicki, L. H. Bruner, K. R. Miller, K. M. Raley-Susman, P. R. Panfil, G. M. K. Humphries, J. W. Parce: *Alternatives Anim. Testing Exp.*, **1**, 154 (1992).
- 90) S. Ekelund, G. Liminga, F. Bjorkling, E. Ottosen, C. Schou, L. Binderup, R. Larsson: *Biochem. Pharmacol.*, **60**, 839 (2000).
- 91) C. Nicolini, M. Lanzi, P. Accossato, A. Fanigliuolo, F. Mattioli, A. Martelli: *Biosens. Bioelectron.*, **10**, 723 (1995).
- 92) C. J. Cao, M. E. Eldefrawi, A. T. Eldefrawi, J. W. Burnett, R. J. Mioduszewski, D. E. Menking, J. J. Valdes: *Toxicol.*, **36**, 269 (1998).

- 93) H. G. Koebe, C. J. Deglmann, R. Metzger, S. Hoerrlein, F. W. Schildberg: *Toxicology*, **154**, 31 (2000).
- 94) C. J. Deglmann, R. Metzger, M. Stickel, S. Hoerrlein, F. W. Schildberg, H. G. Koebe: *Int. J. Artif. Organs*, **25**, 975 (2002).
- 95) B. Wolf, M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret, M. Kraus: *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 501 (1998).
- 96) B. Wolf, M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret, T. Henning, M. Lehmann, A. Schwinde: *Tumor Biol.*, **19**, 374 (1998).
- 97) B. Wolf, M. Kraus, M. Brischwein, R. Ehret, W. Baumann, M. Lehmann: *Biosens. Bioelectron.*, **46**, 215 (1998).
- 98) W. H. Baumann, M. Lehmann, A. Schwinde, R. Ehret, M. Brischwein, B. Wolf: *Sens. Actuators B*, **55**, 77 (1999).
- 99) R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, M. Lehmann, T. Henning, I. Freund, S. Drechsler, U. Friedrich, M.-L. Hubert, E. Motrescu, A. Kob, H. Palzer, H. Grothe, B. Wolf: *Fresenius J. Anal. Chem.*, **369**, 30 (2001).
- 100) M. Brischwein, E. R. Motrescu, E. Cabala, A. M. Otto, H. Grothe, B. Wolf: *Lab Chip*, **3**, 234 (2003).
- 101) A. M. Otto, M. Brischwein, A. Niendorf, T. Henning, E. Motrescu, B. Wolf: *Cancer Detect. Prev.*, **27**, 291 (2003).
- 102) P. Bergveld: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **17**, 70 (1970).
- 103) 勝部昭明: まてりあ, **34**, 1215 (1995).
- 104) M. J. Schoning, A. Poghossian: *Analyst*, **127**, 1137 (2002).
- 105) M. Yuqing, G. Jianguo, C. Jianrong: *Biotechnol. Adv.*, **21**, 527 (2003).
- 106) D. Schubnell, M. Lehman, W. Baumann, F. G. Rott, B. Wolf, C. F. Beck: *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 465 (1999).
- 107) M. Lehman, W. Bauman, M. Brischwein, R. Ehret, M. Kraus, A. Schwinde, M. Bitzenhofer, I. Freund, B. Wolf: *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 117 (2000).
- 108) S. Martinoia, N. Rosso, M. Grattarola, L. Lorenzelli, B. Margesin, M. Zen: *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 1043 (2001).
- 109) L. Lorenzelli, B. Margesin, S. Martinoia, M. T. Tedesco, M. Valle: *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 621 (2003).
- 110) B.-K. Sohn, C.-S. Kim: *Sens. Actuators B*, **34**, 435 (1996).
- 111) M. Lehmann, W. Baumann, M. Brischwein, H.-J. Gahle, I. Freund, R. Ehret, S. Drechsler, H. Palzer, M. Kleintges, U. Sieben, B. Wolf: *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 195 (2001).
- 112) P. Bergveld, J. Wiersma, H. Meertens: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **23**, 136 (1976).
- 113) D. J. Jobling, J. G. Smith, V. Wheal: *Med. Biol. Eng. Comput.*, **19**, 553 (1981).
- 114) P. Fromherz, A. Offenhausser, T. Vetter, J. Weis: *Science*, **252**, 1290 (1991).
- 115) S. Vassaneli, P. Fromherz: *Appl. Phys. A*, **66**, 459 (1998).
- 116) C. Sprossler, M. Denyer, S. Britland, W. Knoll, A. Offenhausser: *Phys. Rev. E*, **60**, 2171 (1999).
- 117) A. Offenhausser, W. Knoll: *Trends Biotechnol.*, **19**, 62 (2001).
- 118) P. Fromherz: *Ber. Bunsen. Phys. Chem.*, **100**, 1093 (1996).
- 119) P. Fromherz, A. Stett: *Phys. Rev. Lett.*, **75**, 1670 (1995).
- 120) A. Stett, B. Muller, P. Fromherz: *Phys. Rev. E*, **55**, 1779 (1997).
- 121) M. Scholl, C. Sprossler, M. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, A. Offenhausser: *J. Neurosci. Methods*, **104**, 65 (2000).
- 122) C. Sprossler, M. Scholl, M. C. Denyer, M. Krause, K. Nakajima, A. Maelicke, W. Knoll, A. Offenhausser: *Synth. Met.*, **117**, 281 (2001).
- 123) J. C. Chang, G. J. Brewer, B. C. Wheeler: *Biosens. Bioelectron.*, **16**, 527 (2001).
- 124) G. Zeck, P. Fromherz: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 10457 (2001).
- 125) A. Chaubey, B. D. Malhotra: *Biosens. Bioelectron.*, **17**, 441 (2002).
- 126) M. Koudelka: *Sens. Actuators*, **9**, 249 (1986).
- 127) H. Suzuki, A. Sugama, N. Kojima, F. Takei, K. Ikegami: *Biosens. Bioelectron.*, **6**, 395 (1991).
- 128) G. Jobst, G. Urban, A. Jachimowicz, F. Kohl, O. Tilado: *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 123 (1993).
- 129) H. Suzuki, H. Ozawa, S. Sasaki, I. Karube: *Sens. Actuators B*, **53**, 140 (1998).
- 130) H. Suzuki: *Electroanal.*, **12**, 703 (2000).
- 131) P. R. Warburton, R. S. Sawtell, A. Watson, A. Q. Wang: *Sens. Actuators B*, **72**, 197 (2001).
- 132) I. Giaever, C. R. Keese: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3761 (1984).
- 133) I. Giaever, C. R. Keese: *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **33**, 242 (1986).
- 134) P. Mitra, C. R. Keese, I. Giaever: *Biotechniques*, **11**, 504 (1991).
- 135) J. Wegener, C. R. Keese, I. Giaever: *Exp. Cell Res.*, **259**, 158 (2000).
- 136) C. R. Keese, I. Giaever: *IEEE Eng. Med. Biol.*, **13**, 402 (1994).
- 137) C. R. Keese, N. Karra, B. Dillon, A. M. Goldberg, I. Giaever: *In Vitro Mol. Toxicol.*, **11**, 183 (1998).
- 138) C. Xiao, B. Lachance, G. Sunahara, J. H. T. Luong: *Anal. Chem.*, **74**, 5748 (2002).
- 139) C. Xiao, J. H. T. Luong: *Biotechnol. Prog.*, **19**, 1000 (2003).
- 140) I. Giaever, C. R. Keese: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 7896 (1991).
- 141) I. Giaever, C. R. Keese: *Nature*, **366**, 591 (1993).
- 142) C. Tiruppathi, A. B. Malik, P. J. D. Vecchio, C. R. Keese, I. Giaever: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 7919 (1992).
- 143) E. Noiri, Y. Hu, W. F. Bahou, C. R. Keese, I. Giaever, M. S. Goligorsky: *J. Biol. Chem.*, **272**, 1747 (1997).
- 144) C. R. Keese, K. Bhawe, J. Wegener, I. Giaever: *Biotechniques*, **33**, 842 (2002).
- 145) T. J. Smith, H.-S. Wang, M. G. Hogg, R. C. Henrikson, C. R. Keese, I. Giaever: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 5094 (1994).
- 146) R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, K. Stegbauer, B. Wolf: *Biosens. Bioelectron.*, **12**, 29 (1997).
- 147) R. Ehret, W. Baumann, M. Brischwein, A. Schwinde, B. Wolf: *Med. Biol. Eng. Comput.*, **36**, 365 (1998).
- 148) T. Henning, M. Brischwein, W. Baumann, R. Ehret, I. Freund, R. Kammerer, M. Lehmann, A. Schwinde, B. Wolf: *Anti-Cancer Drugs*, **12**, 21 (2001).
- 149) M. K. Yamada, K. Clark: *Nature*, **419**, 790 (2002).

- 150) T. Jacks, R. A. Weinberg: *Cell*, **111**, 923 (2002).
- 151) A. Abbott: *Nature*, **424**, 870 (2003).
- 152) M. L. Li, J. Aggeler, D. A. Farson, C. Hatier, J. Hassell, M. J. Bissell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 136 (1987).
- 153) M. H. Barcellos-Hoff, J. Aggeler, T. G. Ram, M. J. Bissell: *Development*, **105**, 223 (1989).
- 154) C. D. Roskelley, P. Y. Desprez, M. J. Bissell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12378 (1994).
- 155) E. Cukierman, R. Pankov, K. M. Yamada: *Curr. Opin. Cell Biol.*, **14**, 633 (2002).
- 156) K. L. Schmeichel, M. J. Bissell: *J. Cell Sci.*, **116**, 2377 (2003).
- 157) V. M. Weaver, O. W. Petersen, F. Wang, C. A. Larabell, P. Briand, C. Damsky, M. J. Bissell: *J. Cell Biol.*, **137**, 231 (1997).
- 158) F. Wang, V. M. Weaver, O. W. Petersen, C. A. Larabell, S. Dedhar, P. Briand, R. Lupu, M. J. Bissell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14821 (1998).
- 159) V. M. Weaver, S. Lelievre, J. N. Lakins, M. A. Chrenek, J. C. R. Jones, F. Giancotti, Z. Werb, M. J. Bissell: *Cancer Cell*, **2**, 205 (2002).
- 160) H. K. Kleinman, M. L. Mcgarvey, L. A. Liotta, P. G. Robey, K. Tryggvason, G. R. Martin: *Biochemistry*, **21**, 6188 (1982).
- 161) H. K. Kleinman, M. L. Mcgarvey, J. R. Hassell, V. L. Star, F. B. Cannon, G. W. Laurie, G. R. Martin: *Biochemistry*, **25**, 312 (1986).
- 162) R. L. Ehrmann, G. O. Gey: *J. Natl. Cancer Inst.*, **16**, 1375 (1956).
- 163) G. Michalopoulos, H. C. Pitot: *Exp. Cell Res.*, **94**, 70 (1975).
- 164) J. T. Emerman, J. Enami, D. R. Pitelka, S. Nandi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4466 (1977).
- 165) J. Yang, S. Nandi: *Int. Rev. Cytol.*, **81**, 249 (1989).
- 166) J. Leighton, G. Justh, M. Esper, R. L. Kronenthal: *Science*, **155**, 1259 (1967).
- 167) T. Elsdale, J. Bard: *J. Cell Biol.*, **54**, 626 (1972).
- 168) J. Yang, J. Richards, P. Bowman, R. Guzman, J. Enami, K. McCormick, S. Hamamoto, D. Pitelka, S. Nandi: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3401 (1979).
- 169) K. Kawamura, J. Enami, S. Enami, M. Koezuka, K. Kohmoto, M. Koga: *Proc. Jap. Acad. Ser. B*, **62**, 5 (1986).
- 170) B. E. Miller, F. R. Miller, G. H. Heppner: *Cancer Res.*, **45**, 4200 (1985).
- 171) D. K. Sinha, C. J. White: *In Vitro Cell Develop. Biol.*, **24**, 525 (1988).
- 172) M. Koezuka, N. Kondo, H. Kobayashi, S. Hara, M. Yasutomi, S. Nishida, S. Hashimoto, H. Asano: *Int. J. Oncol.*, **2**, 953 (1993).
- 173) H. Kobayashi, M. Higashiyama, K. Minamigawa, K. Tanisaka, T. Takano, H. Yokouchi, K. Kodama, T. Hata: *Jpn. J. Cancer Res.*, **92**, 203 (2001).
- 174) Y. Takamura, H. Kabayashi, T. Taguchi, K. Motomura, H. Inaji, S. Noguchi: *Int. J. Cancer*, **98**, 450 (2002).
- 175) S. M. O'Connor, J. D. Andreadis, K. M. Shaffer, W. Ma, J. J. Pancrazio, D. A. Stenger: *Biosens. Bioelectron.*, **14**, 871 (2000).
- 176) W. Tan, T. A. Desai: *Biomed. Microdevices*, **5**, 235 (2003).
- 177) Y. Torisawa, T. Kaya, Y. Takii, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue: *Anal. Chem.*, **75**, 2154 (2003).
- 178) Y. Torisawa, H. Shiku, S. Kasai, M. Nishizawa, T. Matsue: *Int. J. Cancer*, **109**, 302 (2004).
- 179) T. Yasukawa, T. Kaya, T. Matsue: *Anal. Chem.*, **71**, 4637 (1999).
- 180) T. Yasukawa, T. Kaya, T. Matsue: *Electroanalysis*, **12**, 653 (2000).
- 181) H. Shiku, T. Shiraishi, H. Ohya, T. Matsue, H. Abe, H. Hoshi, M. Kobayashi: *Anal. Chem.*, **73**, 3751 (2001).
- 182) T. Kaya, M. Nishizawa, T. Yasukawa, M. Nishiguchi, T. Onouchi, T. Matsue: *Biotechnol. Bioeng.*, **76**, 391 (2001).
- 183) T. Kaya, Y. Torisawa, D. Oyamatsu, M. Nishizawa, T. Matsue: *Biosens. Bioelectron.*, **18**, 1379 (2003).
- 184) Y. Takii, K. Takoh, M. Nishizawa, T. Matsue: *Electrochimica Acta*, **48**, 3381 (2003).
- 185) T. Yasukawa, I. Uchida, T. Matsue: *Biophys. J.*, **76**, 1129 (1999).
- 186) B. Liu, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 9855 (2000).
- 187) W. Feng, S. A. Rotenberg, M. V. Mirkin: *Anal. Chem.*, **75**, 4148 (2003).
- 188) A. W. Hamburger, S. E. Salmon: *Science*, **197**, 461 (1977).
- 189) Y. Saikawa, T. Kubota, T. Furukawa, A. Suto, M. Watanabe, K. Kumai, K. Ishibiki, M. Kitajima: *Jpn. J. Cancer Res.*, **85**, 762 (1994).
- 190) T. Kubota, N. Sasano, O. Abe, I. Nakao, E. Kawamura, T. Saito, M. Endo, K. Kimura, H. Demura, H. Sasano, H. Nagura, N. Ogawa, R. M. Hoffman: *Clin. Cancer Res.*, **1**, 1537 (1995).
- 191) E. Brown, M. Markman: *Cancer*, **77**, 1020 (1996).
- 192) T. Kondo, T. Imamura, H. Ichihashi: *Gann*, **57**, 113 (1966).
- 193) T. Mosmann: *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
- 194) M. Ishiyama, H. Tominaga, M. Shiga, K. Sasamoto, Y. Ohkura, K. Ueno: *Biol. Pharm. Bull.*, **19**, 1518 (1996).
- 195) M. Fujita, K. Tanigawa, F. Fujita, Y. Sakamoto, K. Shimosuma, T. Kusuyama, H. Inaba, T. Taguchi: 癌と化学療法, **16**, 3435 (1989).
- 196) R. A. Vescio, C. H. Redfern, T. J. Nelson, S. Ugoretz, P. H. Stern, R. M. Hoffman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 5029 (1987).
- 197) T. Furukawa, T. Kubota, M. Watanabe, T. Takahara, H. Yamaguchi, T. Takeuchi, S. Kase, S. Kodaira, K. Ishibiki, M. Kitajima, R. M. Hoffman: *Int. J. Cancer*, **51**, 489 (1992).
- 198) S. Ekelund, P. Nygren, R. Larsson: *Anti-Cancer Drugs*, **9**, 531 (1998).
- 199) D. Cooke, R. O'Kennedy: *Anal. Biochem.*, **274**, 188 (1999).
- 200) R. Metzger, C. J. Deglmann, S. Hoerrlein, S. Zapf, J. Hilfrich: *Toxicology*, **166**, 97 (2001).

要 旨

細胞を用いたアッセイ法は、細胞機能の評価や薬剤スクリーニング、環境モニタリングに広く利用されている。近年の細胞培養技術及び微細加工技術の進歩に伴い、細胞のチップ化、集積化によるアッセイ法の開発が盛んに検討されている。細胞チップによるアッセイ法は、少量の試料で多項目を評価可能であり、迅速かつ簡便なアッセイ法の構築が期待される。本稿では、細胞及びセンサーを基板上に集積化した細胞チップによるアッセイ法について総説する。細胞集積化技術としては、細胞パターンニング技術及び3次元培養技術に関して紹介する。これらの培養技術は、細胞の分化機能や極性機能を制御可能とし、*in vitro*において生体内機能の再現が期待されている。細胞機能の評価法としては、非侵襲測定法であるpH、酸素、インピーダンス測定について紹介する。また、細胞チップの特徴を生かした適用例として、患者より摘出したがん組織を対象とした、抗がん剤感受性試験への応用について紹介する。