

東京電機大学

博 士 論 文

マイクロ流体チップ上でのマルチガスインキュベーション  
を用いた低酸素細胞培養システム

On-chip multi-gas incubation for microfluidic cell  
cultures under hypoxia

2015 年 3 月

高野 温

# 目次

概要 .....	1
第 1 章 序論 .....	2
1.1. 低酸素培養の意義 .....	2
1.2. 従来の低酸素培養法 .....	4
1.3. マイクロ流体システムを用いた低酸素培養法 .....	5
1.4. オンチップ CO <sub>2</sub> インキュベーション .....	6
1.5. 低酸素培養に向けたジャケット液 .....	9
1.6. オンチップマルチガスインキュベーション .....	10
1.7. 第 1 章まとめ .....	12
第 2 章 目的 .....	13
第 3 章 低酸素細胞培養システムの製作 .....	14
3.1. マイクロ流体チップの設計要件 .....	14
3.2. 目的 .....	15
3.3. 実験方法 .....	16
3.3.1. マイクロ流路の型の製作 .....	16
3.3.2. マイクロ流体チップの部品製作 .....	18
3.3.3. マイクロ流体チップの部品洗浄 .....	20
3.3.4. マイクロ流体チップの組み立て .....	21
3.3.5. マイクロ流体チップの使用準備 .....	22
3.3.6. 低酸素細胞培養システムの構築 .....	23
3.4. 結果 .....	24
3.4.1. マイクロ流体チップ .....	24
3.4.2. 低酸素細胞培養システム .....	25
3.5. 第 3 章まとめ .....	26

第 4 章 オンチップマルチガスインキュベーションの評価 .....	27
4.1. 背景.....	27
4.2. 目的.....	28
4.3. 実験方法 .....	29
4.3.1. pO <sub>2</sub> 測定セットアップの構築.....	29
4.3.2. ジャケット液の調製と封入 .....	29
4.3.3. マイクロ流体チップの pO <sub>2</sub> 測定.....	29
4.3.4. マイクロ流体チップの pCO <sub>2</sub> 測定 .....	30
4.4. 結果と考察 .....	30
4.4.1. pO <sub>2</sub> の測定セットアップ .....	30
4.4.2. pO <sub>2</sub> 測定.....	31
4.4.3. NaHCO <sub>3</sub> と Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> で調製したジャケット液の pCO <sub>2</sub> .....	33
4.4.4. NaHAsc を加えた場合の pCO <sub>2</sub> .....	35
4.5. 第 4 章まとめ .....	39
第 5 章 オンチップ低酸素細胞培養.....	41
5.1. 背景.....	41
5.2. 目的.....	42
5.3. 実験方法 .....	42
5.3.1. 低酸素プローブによる評価実験 .....	42
5.3.2. 細胞の生死判定試薬による評価実験.....	43
5.4. 結果と考察 .....	44
5.4.1. 低酸素プローブによる評価 .....	44
5.4.2. 生死判定試薬による評価.....	45
5.5. 第 5 章まとめ .....	48
第 6 章 結論 .....	49
第 7 章 今後の研究展開.....	50
謝辞 .....	51
参考文献.....	53

# 概要

大気中の酸素分圧（約 21%）よりも低い酸素分圧下で培養した細胞は、大気中の酸素分圧下で培養した場合とは異なる細胞応答が起きることが知られている。特に近年では、血管新生や細胞分化などの、医学的にも生物学的にも興味深い現象に細胞の低酸素応答系が関わっていることを示す結果が数多く報告されている。しかし、低酸素細胞培養システムは、その重要性に見合うだけの普及をみているとはいえない。現在行われている低酸素培養方法の代表的なものとして、水分、炭酸ガスと窒素ガスを庫内に導入して低酸素培養雰囲気をつくりだすインキュベータ（マルチガスインキュベータ）の利用がある。この方法は、マルチガスインキュベータ本体だけでなく炭酸ガスと窒素ガスのボンベ、ガスの流量制御機器が必要なことに加えて、常に窒素ガスを流入し続ける経済的な負担がかかる。加えて、異なる酸素濃度での培養には、複数台のインキュベータが必要になり、たとえシャーレ 1 枚の培養でも培養装置を占有することとなる。また、培養容器内の培地の溶存酸素が周囲の気相の酸素濃度と平衡に達するまでに数時間がかかることが知られており、ある酸素濃度下に曝露した時間に依存する細胞の挙動を評価する場合に問題となる。

そこで、本研究では、従来の方法では困難な、異なる酸素濃度の細胞挙動への影響を省スペースで調べる方法として、マイクロ流体のもつ溶存酸素濃度の高い制御性と省スペース性、低コストを活かして、マイクロ流路に導入する培地の炭酸ガス分圧と酸素分圧を同時に調節でき、かつ煩雑な周辺機器を要しない低酸素細胞培養システムを開発した。この新規開発した培養システムの性能評価として、マイクロ流体チップ上の炭酸ガス分圧および酸素分圧の測定と、実際に細胞をチップ内に導入して低酸素培養を実施した。その結果、チップ上の炭酸ガス分圧を 5% に維持した状態で酸素分圧を 5-21% の範囲で任意の値に少なくとも 3 日間は、ほぼ一定値に調節する方法が明らかになった。低酸素培養した細胞は、低酸素の度合に応じた蛍光強度が変化するプローブを用いて評価を行い、開発した培養システムで低酸素細胞培養が実施できることを示した。以上より、本低酸素細胞培養システムは、細胞周囲の酸素雰囲気制御性の向上と低酸素培養の経済的・空間的コストを解消したことで導入障壁を下げ、低酸素培養に対して、有用な実験手段を提供した。

# 第 1 章 序論

## 1.1. 低酸素培養の意義

酸素は、現在の地球の大気中において約 21%を占めており、ほとんどの生物にとってなにかのかたちで生存に関わり、影響を及ぼす元素である。

ヒトにとって酸素は、生存に必要不可欠であることは語るまでもないが、その一方で、ヒトの生体内での酸素濃度は、大気中のように一定でなく、部位により異なることが予想されていた。というのも、生体内で酸素は、血中のヘモグロビンと結合し、血流にのって全身を循環しながら運搬される。そのため、特に、生体内で血管が伸びていない領域や静脈血のように酸素含有量が少ない血流の周辺にある組織や細胞では、供給される酸素量は総じて少なくなり、酸素濃度が低くなるであろうことを誰もが認識していたからである。

今日では、ヒトの生体内の多くの部位について酸素分圧の実測が可能になり、様々な組織での測定結果がまとめられている[1,2]。報告より、ヒトの生体内の酸素分圧は、動脈血流を除くほとんどの部位で 10%以下となり、大気に比べて低酸素であることが示された。加えて、1992年に発見された低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible factor : HIFs) [3]は、ヒトの生体内で起きる様々な現象が、低酸素に応答して分子、遺伝子レベルの制御が行われることを示唆するもので、これ以降、多くの生体現象について、低酸素が及ぼす影響を調べるきっかけをつくった。特に、生体内の血管新生や細胞の分化、細胞死のような生物学的にも医学的にも興味深く、重要な現象について、低酸素が与える影響を調べた報告[4-6]が数多く行われ、低酸素がヒトの生体内で重要な役割を担っていることが、次々と明らかになってきている。

このような研究情勢において、低酸素に対する細胞の応答反応のような、生体内の複雑系で起きている生命現象を詳細に調べるには、生体外で細胞を低酸素培養する手段は重要な役割をもつ。実験動物などの個体を利用した研究では、低酸素環境の影響を検討することは難しい。遺伝子やタンパク質が関与する低酸素環境下で起こる分子機構を解明するには、ミクロな実験条件の設定が容易な生体外での低酸素培養を用いるのが自然といえる。

図 1-1 にトムソン・ロイター社の学術文献データサービス Web of Science を使用して、Hypoxia(=低酸素)でキーワード検索して得られた論文数を 1 年毎にまとめたグラフを示す。論文数は、HIFs が発表された年(1992 年)の 1990 年代前半から次第に増大しているのがわかる。すべてが生体系での低酸素応答現象を扱った報告とは限らないが、低酸素に対して興味や関心をもつ人々が増えたであろうことがうかがえる。他に論文数が増大した理由として、低酸素の影響は、分子や遺伝子だけでなく、細胞、組織、器官まであらゆる生体の階層に及ぶため、研究分野も学際的となる。HIFs と関与する転写反応や分子などを標的にした投薬や治療法、治療に伴う副作用についてまとめた報告[7,8]もあり、広範かつ多岐にわたる研究領域にまたがり展開するテーマであることがいえる。HIFs が発見されてから約 20 年経つが、生体で起きる現象と低酸素の関係はまだまだ明らかになっていないことが多い。今後も、生体外で低酸素培養する実験系は、生体内では設定が難しい研究条件を整え、生体内で起こる現象を推定するための重要な研究方法として、より一層、重要性が増していくことに疑念の余地はない。

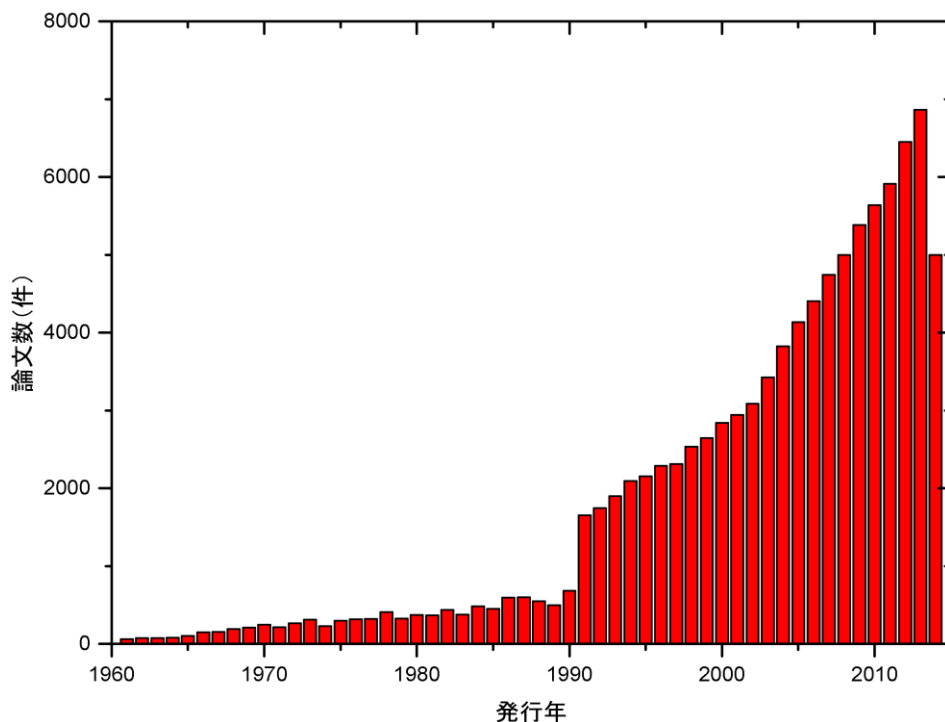


図 1-1. 低酸素に関する論文数の推移 学術文献データベース Web of science で Hypoxia(=低酸素)をキーワードにして検索して、1960年から2014年10月初旬までの期間で、発表された文献件数をグラフ化した。X軸は発行年、Y軸は文献数を表す。文献数は、年々増加傾向にある。(グラフは、2014年10月3日に行った文献検索に基づき作成した。)

## 1.2. 従来の低酸素培養法

生体外での低酸素培養システムは、前項で述べたように重要な実験方法であるが、低酸素培養法は、その重要性に見合うだけの普及をみているとはいえない。

これまでに用いられてきた低酸素培養方法を表 1 に示した。表中のバブリング[9]と化学的低酸素刺激[10]は、培地に対してそれぞれ窒素ガス、塩化コバルト水和物を溶解させて低酸素または低酸素様の培養雰囲気をつくる。しかし、前者は、開放系でも気液交換が起きるため低酸素状態の恒常的な維持が難しく、再現性と安定性の確保が困難となる。後者は、HIF-水酸化酵素がコバルトイオン( $\text{CO}^{2+}$ )によって阻害するよう培地組成を特殊化して擬似的な低酸素状態をつくり、特定の低酸素応答反応を活性化する方法のため、実際のところ低酸素培養ではなく、用途は限定的になる。

表 1 の残り 3 つの方法[11-13]は、いずれも細胞培養容器を閉鎖系のチャンバ内に配置して、そのチャンバ内の空間をまるごと低酸素雰囲気にして低酸素培養を行う。これらの方法は、いずれもセンサによる制御が行われるため安定した低酸素雰囲気を安定して実現できるが、経済的のみならず空間的な負担が大きくなる。これら 3 つの方法のなかで最も普及しているマルチガスインキュベータで具体的な例を挙げると、例えば、培養細胞に低酸素応答が起きる酸素分圧の閾値を調べる場合、複数の酸素分圧で同時に培養を実施するには、濃度条件の数だけマルチガスインキュベータを複数台用意する必要がある。加えて、たとえシャーレ 1 枚を低酸素培養する場合でも、インキュベータを占有するので、培養容器に対して低酸素制御した空間が余剰になる。特に、低酸素培養する実験では、培養細胞に対して異なる酸素分圧や低酸素への曝露時間の影響を調べる機会が多いことをふまえると、経済的、空間的負担のもたらす導入障壁は顕著となる。

他にも、培養容器内の培地の溶存酸素は、周囲の気相の酸素分圧と平衡するまでの時間が約 3 時間と長く[14]、ある酸素分圧下に曝露した時間に依存する細胞の挙動を評価する場合には、実験条件の設定が困難である。

表 1-1. 低酸素培養の方法と特徴 主な低酸素培養方法を列挙して各方法の概要，長所と短所をまとめた。

方法名	概要	長所と短所
バブリング[9]	培地に窒素ガスを導入して，窒素で酸素を置換する。	古典的で簡便であるが，低酸素雰囲気を維持するための実験系の構築が難しい。
化学的 低酸素刺激[10]	培地に試薬を添加して，疑似的な低酸素刺激を与える。	大気酸素濃度下であっても HIF1 に対し低酸素様の環境をつくれるが，使用する実験が限定される。
低酸素培養 チャンバ[11]	培養容器を入れたチャンバ内を窒素ガス置換して低酸素にする。	使用実績が高い製品もある。インキュベータの援用が必要。
マルチガスイン キュベータ[12]	庫内の温度・湿度を一定に保ち，ガスボンベから配管した炭酸ガスと窒素ガスを吸入する。	最も普及した方法といえる。経済的・空間的な負担が大きい。
低酸素ワークス テーション[13]	グローブボックス内を低酸素状態にする。	ボックス内の空間を低酸素にするので培養以外の実験操作も可能。専門性の高い装置で非常に高額。

### 1.3. マイクロ流体システムを用いた低酸素培養法

従来の方法では困難な，異なる酸素雰囲気での細胞挙動への影響を省スペースで調べる方法として，マイクロ流体システムによる低酸素培養方法が提案されている。マイクロ流体システムは，研究分野として確立したのは 1990 年ごろからと若い分野であるが，ピコリットル～マイクロリットル程度の微量の流体を取り扱う流体操作ができることから，ナノリットルガスクロマトグラフィー(GPC)や高速液体クロマトグラフィー(HPLC)のような分子分析だけでなく，DNA やタンパクなどの極小な生体試料を取り扱えるため分子生物学との適合性が高く，さらに微小電気機械システム(micro-electrical-mechanical system: MEMS)の製作技術を応用できることから，生命科学のための新たな研究方法の創出が期待されている分野である[15]。約 25 年経過した現在では，細胞培養に限ってみても，マイクロ流体チップを利用した多様な培養システムが開発された。マイクロ流体システムによる細胞培養に関するいくつかの総説[16,17]によると，生体内の主要な臓器の細胞株や初代培養細胞の多くは培養実績があり，ほかにも，微細加工技術を駆使して流路内に 2 次元または 3 次元構造をつくり，生体内に近づけた環境で共培養する試みも行われている。



マイクロ流体システムによる低酸素培養についても、バルクの流体に比べて表面体積比 (SAV ratio : surface-area-to-volume ratio) が大きいことから、酸素雰囲気周囲の雰囲気迅速に追従させることができ、高い Peclet 数をもつため、マイクロ流路内での拡散や混合が起きにくく、明確な濃度勾配を生成しやすい特性を活かした培養系が報告されている。

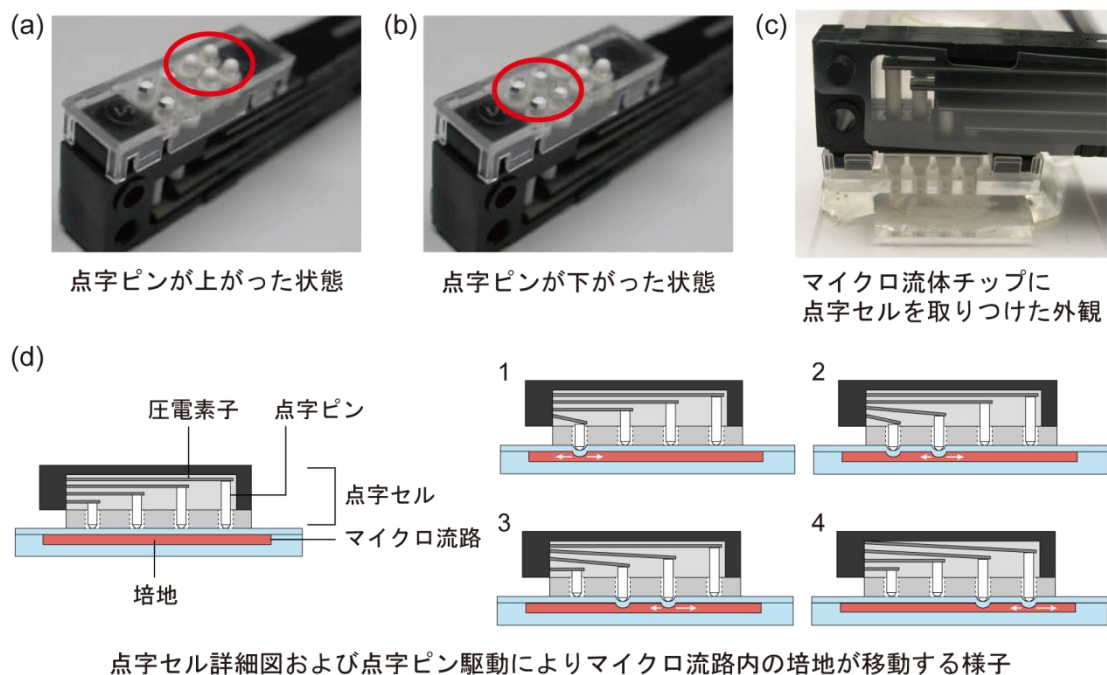
しかし、これらの濃度勾配を時間的に安定させるために、流量と周囲の酸素分圧の厳密な制御と必要とする。その結果、シリンジポンプや長いチューブなどをシステム内に含むため、非専門家のエンドユーザーにとっては、本来取り組むべき細胞培養の課題に、システムの取り回しの煩雑さという問題を付け加えることになる。さらに、勾配中の濃度分布を明確にする、すなわち校正の作業が容易でなく、これと各種細胞培養操作等の作業とを両立させるのはきわめて難しいといえる。以上より、マイクロ流体チップを利用した低酸素培養方法には、酸素分圧の制御性と低スペース性、かつそれに煩雑な機器を要しない培養システムが望ましいといえる。

## 1.4. オンチップ CO<sub>2</sub> インキュベーション

マイクロ流体チップ上の酸素濃度を制御する方法は、先頃報告された総説[18]にも多数の低酸素培養システムが挙げられている。しかし、それらシステムの多くが、酸素分圧の制御性のために低スペース性や流量計のような機器を使用している。

そこで、マイクロ流体チップの酸素分圧の制御をシンプルに行う手段として、著者がこれまで取り組んできた、マイクロ流体チップ上の炭酸ガス分圧を調節するオンチップ CO<sub>2</sub> インキュベーション(OCI : On-chip CO<sub>2</sub> incubation)による細胞培養システム[19,20]から着想を得た。

まず、OCI による細胞培養システムの開発背景であるが、2004 年に報告されたベル型断面形状を有するマイクロ流路の製作方法[21]とその流路を使用したマイクロ流体制御方法[22]にさかのぼる。これらの報告で示されたマイクロ流体システムは、点字デバイスと呼ばれる小型のアクチュエータ(図 1-2)によって、ベル型断面形状を有するマイクロ流路内を流れるマイクロ流体の流量や方向をコントロールするものであった。典型的なマイクロ流体システムにありがちな煩雑な周辺機器(無数の配管、流量計やシリンジポンプのような送液装置)を使わずに流体制御ができるため、可搬性や独立性を有したマイクロ流体システムといえる特徴があった。その後、これらのマイクロ流体システムの特徴を活かして、マイクロ流体チップ上でマウス筋芽細胞を循環培養する様子を、顕微鏡ステージ上で数日間にわたり経時観察できる細胞培養システムが報告された[23]。ただし、この培養システムでは、細胞培養に適した培地 pH の維持のため、特別な組成に調製した特殊培地を使用しており、一般的な培地の使用が制限されることから、汎用性の面で課題を残していた。

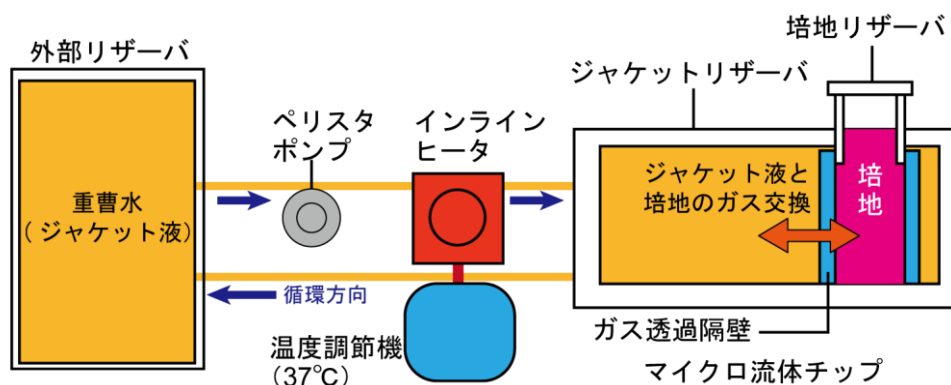


**図 1-2. 点字デバイスの外観と送液方法** 点字ピンが動作する外観(a-c)とマイクロ流体が流路内で遷移する様子(d)を示した。点字セルに格納した点字ピンがコンピュータ制御により上下に駆動する(a,b)もので、点字ピン突出面とマイクロ流路表面を接触させて運用する(c)。点字ピンで、弾性体でつくられたベル型断面をもつマイクロ流路を加圧変形して流路内の液体を押し出し、マイクロ流路内の送液を行う(d: 1-4)。

特殊な組成の培地を使用せず、点字デバイスを用いた細胞培養を行うべく、著者らは、培地組成に依らずに培地 pH を維持する方法として、マイクロ流体チップ上の炭酸ガス分圧を調節するオンチップ CO<sub>2</sub> インキュベーション(OCI)による細胞培養システム開発した[19]。

図 1-3 に、製作した細胞培養システムの模式図を示した。外部リザーバ内とチップを配管でつなぎ、ヒータを通過する液体を 37°C に調温する温度調節機をつけたインラインヒータを導入した。外部リザーバ内のジャケット液(重曹水)は、ペリスタポンプにより送液され、チップ内に導入される直前にインラインヒータで 37°C に加温される。マイクロ流体チップは、ジャケットリザーバと培地リザーバがガス透過壁で隔たれている。それぞれジャケット液と培地を入れてあり、ガス透過壁を介して接触するため、ジャケット液から生じる炭酸ガス・水分・熱を培地に供給する。

この細胞培養システムは、マイクロ流体チップ上でガス透過隔壁を介して培地と加温した重曹水を接触させるだけで、培地 pH を 3 日程度は維持することを明らかにした。しかし、培地を囲うように展開して炭酸ガスを供給する重曹水(ジャケット液)は、外部リザーバ内からチップへ加温しながら循環導入する必要があるため、点字デバイスを使用した細胞培養システム本来の利点である、可搬性や独立性が損なわれた。



**図 1-3. ジャケット液を加温してチップに循環導入する細胞培養システム概念図** 外部リザーバ内のジャケット液は、チップのジャケットリザーバ内に 37°C に加温して導入するため、ペリスタポンプで常時循環している。なお、細胞はマイクロ流体チップ底部にあるマイクロ流路内で培養するが、図中では簡単のため省略した。

続いて、図 1-4 に示した、マイクロ流体チップ上の炭酸ガス分圧の調節に用いる水溶液(=ジャケット液)をチップに封入することで、可搬性を損なわずに OCI を実施する長期培養システムを開発した[20]。チップにジャケット液を封入するにあたり、加熱した重曹水の循環導入をやめると、重曹水から発生する炭酸ガスが短時間で枯渇する技術課題があったが、重炭酸-炭酸緩衝系を利用して、重曹水に少量の炭酸ナトリウムを加えて炭酸ガスの発生を穏和にして、長期にわたり安定して炭酸ガスを供給する方法を明らかにした。そして、重曹水と炭酸ナトリウムの組成検討を行ったジャケット液をチップに封入することで、2 週間以上にわたりチップ上の炭酸ガス分圧をほぼ 5% のまま、一定に維持できた。その結果、アフリカミドリザル腎臓由来細胞(COS-7 細胞)の 2 週間以上の長期培養を達成し、OCI による点字デバイスを用いた長期培養システムを確立した。

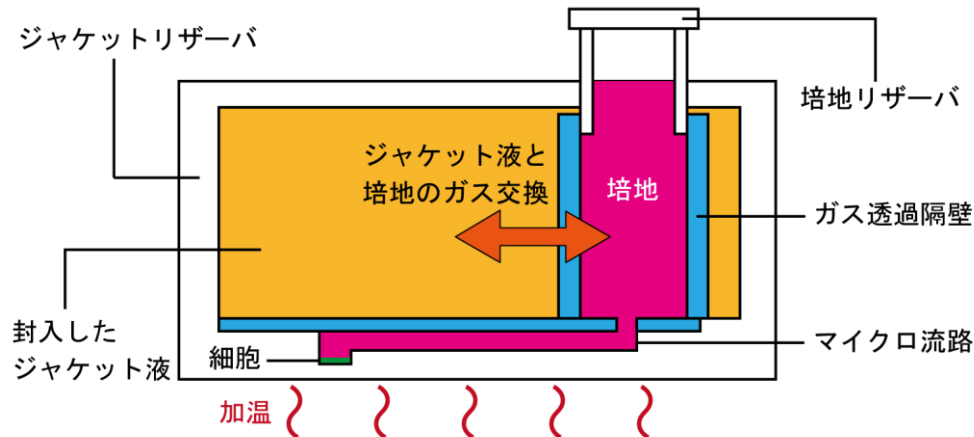


図1-4. ジャケット液を封入するマイクロ流体チップによる細胞培養システムの概念図 ジャケット液を封入したチップの底面を加温して、ジャケット液からの炭酸ガス、水分がガス透過隔壁を透過して培地に供給される。細胞培養に適した状態に維持された培地は、マイクロ流路内を循環して流路内の細胞に供給される。

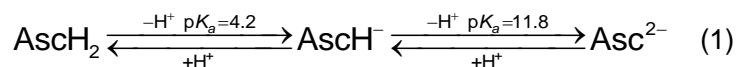
酸素吸収剤を調べ、水溶性で入手しやすく、毒性が低いものとしてアスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)を選定したことから、これまで OCI に使用したジャケット液に酸素吸収剤を加えることで、炭酸ガス分圧と同様に酸素分圧も同時に調節できると類推した。そして、点字デバイスが得意とする循環培養を行うことで、煩雑な培養機器を使わずとも、チップと点字デバイスで構成されるシンプルな培養系でマイクロ流体下での低酸素培養システムが実現するのではないかという考えに至った。

## 1.5. 低酸素培養に向けたジャケット液

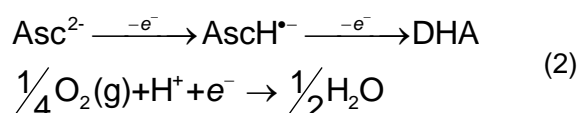
これまでに培った、オンチップでの炭酸ガス分圧の調節を駆使して、炭酸ガスを発生して、酸素を吸収するようなジャケット液の組成を検討して、これまでに製作してきたマイクロ流体チップに封入する。

炭酸ガスの発生反応は、長期培養チップに使用した、重曹( $\text{NaHCO}_3$ )と炭酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )を用いる。一方、酸素吸収には、アスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)を用いる。NaHAsc は、アスコルビン酸( $\text{AscH}_2$ : Ascorbic acid)のナトリウム塩で、白色粉末で水によく溶ける特性がある。ビタミン C の別名で知られ、抗酸化作用をもち、酸素吸収剤としての使用実績がある[24]。

アスコルビン酸は、二塩基酸であり、容易に水に溶解して、以下の(1)式のように 1 価のアスコルビン酸アニオン( $\text{AscH}^-$ : Ascorbate monoanion)か 2 価のアスコルビン酸アニオン( $\text{Asc}^{2-}$ : Ascorbate dianion)になる[25]。



これら 2 つのアニオンは、両方とも自動酸化して、アルコールビン酸ラジカル( $\text{AscH}^{\cdot-}$ )を経て、最終的にデヒドロアスコルビン酸(DHA: dehydroascorbic acid)になり、水中の酸素を減少させる。しかし、2 つのアニオンのうち、 $\text{AscH}^-$ は、還元電位が高いため電子を放出しにくく、pH 中性域ではほとんどラジカル化しない。他方、 $\text{Asc}^{2-}$ は、容易にラジカル化して  $\text{AscH}^{\cdot-}$  になり [26]、やがて DHA となる。これより、アスコルビン酸アニオンの酸化反応は、以下の(2)式にまとめられる。



アスコルビン酸の酸化反応で注目すべきは、 $\text{AscH}_2$  の第二酸解離定数が 11.8 と高く、pH 中性域での  $\text{AscH}_2$  の自動酸化は、かなり遅くなることである(ただし、pH が上昇した場合はその限りでなく、pH が 1 上昇するにつき、自動酸化は 10 倍の速さで進行することが知られている [27])。このような理由から、 $\text{AscH}_2$  は、反応が穏やかで、マイルドな酸素吸収反応であり、ジャケット液に溶解しても、 $\text{NaHCO}_3$  と  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  による重炭酸緩衝系に干渉しにくいと予想される。他にも、二価の鉄イオンやフェノール系化合物などの酸素吸収剤と比較して、毒性が低く、水に溶かしても透明になる長所がある。

以上より、低酸素培養に向けたジャケット液の組成は、炭酸ガスの供給源に  $\text{NaHCO}_3$  と  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 、酸素吸収源に  $\text{NaHAsc}$  を使用するとした。

## 1.6. オンチップマルチガスインキュベーション

マイクロ流体のもつ高い酸素分圧の制御性と低スペース性、ならびに流体システムのもつ本来の高い酸素分圧の正確度とを両立すべく、既存のマイクロ流路に導入する培地の酸素分圧ならび炭酸ガス分圧を同時に調節でき、かつそれに煩雑な機器を要しない低酸素培養システムとして、オンチップマルチガスインキュベーション(OCMI: On-chip multi-gas incubation)を提案する。

OCMI による、オンチップで炭酸ガス分圧および酸素分圧を同時に調節するマイクロ流体システム概念図を図 1-5 に示す。マイクロ流体チップ上の炭酸ガス分圧と酸素分圧の調節は、前項で述べた重曹、炭酸ナトリウム、アスコルビン酸ナトリウムで調製したジャケッ

ト液をチップに封入し、炭酸ガスの供給と酸素の吸収を行う。なお、封入する方法は、マイクロ流体チップのジャケットリザーバの注入口からジャケット液を入れて、注入口をテープで封止する。一方、培地リザーバは、内部へのアクセス向上とコンタミのリスク低減のためにスクリーキャップで開閉できるねじ口部と円筒形状のシリコン成型物で構成する。チップ上で行われるジャケット液と培地のガス交換は、シリコン成型物の隔壁を介して行われる。培地リザーバ内の培地は、ジャケット液から炭酸ガス(CO<sub>2</sub>)と水分の供給をうけ、かつ、培地からジャケット液に移動した酸素が吸収される。この結果、培地リザーバの培地は、酸素濃度だけでなく、pHと浸透圧も同時に調整されて、低酸素培養に適したコンディションを維持することが可能となる。

培地リザーバ内で炭酸ガスと酸素についてオンチップマルチガスインキュベーションされた培地は、培地リザーバと連通したマイクロ流路内を循環する。この培地循環は、点字駆動領域に取りつけた点字デバイスによる送液で行われる。これより、マイクロ流路内にある細胞培養ウェルに配置した細胞は、常に低酸素培養に供給されることで、細胞は低酸素状態で培養される。なお、細胞培養に必要な温度は、チップ底部をヒータで 37°Cに加熱して供給される。

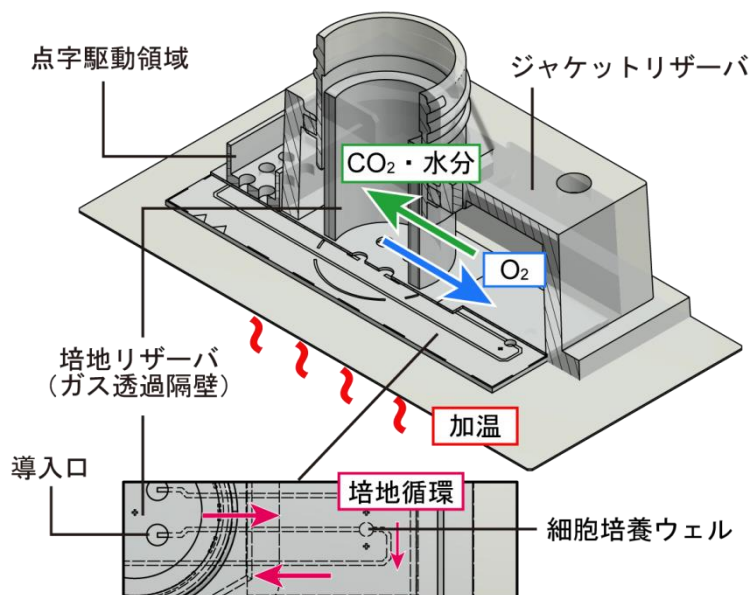


図 1-3. オンチップマルチガスインキュベーションのためのマイクロ流体チップの概念図  
チップ上で行われるガス交換と点字デバイスによる流路内の培地循環を示した。

## 1.7. 第1章まとめ

低酸素培養は、その重要性に比して、経済的のみならず空間的な負担の大きさがボトルネックとなり広く一般に普及しにくい実験方法と考えた。特に、異なる酸素濃度の細胞挙動への影響を省スペースで調べる実験系は、従来の低酸素培養方法の欠点を顕在化させた。この実験系に対して、マイクロ流体チップによる培養システムは解決策となるが、使用には煩雑な操作や専門性が求められ、根本的な解消とはならなかった。

そこで解決策として、点字デバイスを使用したオンチップ長期培養システムの応用を提案した。このシステムは、従来のマイクロ流体システムに比べて煩雑な操作や周辺機器を排した培養システムであり、低酸素培養には、チップに入れるジャケット液の組成検討だけで済むことが予想できる。よって、酸素吸収源として選定したアスコルビン酸をつかってジャケット液の詳細な組成検討を行うことで、マイクロ流体のもつ高い酸素雰囲気への制御性と低スペース性と流体システムが本来有している酸素分圧調節の正確性を両立させる低酸素細胞培養システムの確立を目指す。

## 第2章 目的

本研究の目指すところは、低酸素培養の実験系に対して、より便利で使いやすい方法を開発して、進展が著しい細胞の低酸素応答に関わる研究に対して、貢献することである。

そこで、低酸素培養方法がより普及したて一般的な実験方法となるには、

- ・培養機器の導入費用のような経済的な負担
- ・必要以上に広い空間に対して培養雰囲気制御をすることで生じる空間的な負担

の2つの要因がボトルネックとなっているとした。

これらを解消すべく、マイクロ流体チップにジャケット液を封入するだけのシンプルな方法で、チップ上の炭酸ガス分圧と酸素分圧を同時に調節する、オンチップマルチガスインキュベーション(OCMI)による低酸素培養システムを開発する。

本研究で製作する低酸素培養システムの評価項目として以下の3点をあげる。

- (1) マイクロ流体チップの製作方法と低酸素培養システムの運用方法の確立。
- (2) オンチップマルチガスインキュベーションによる培養雰囲気の調節機能を  
マイクロ流体チップ上の酸素分圧および炭酸ガス分圧測定で評価
- (3) 低酸素培養システムでの細胞培養による、低酸素培養システムとしての適性評価。

(1)は、マイクロ流体チップとチップを含む低酸素培養システムを設計、製作して検討する。チップは、外からチップ内に酸素が通気しないような気密性に優れたものが望ましい。チップの設計や製作手順の最適化を行った成果は、第3章で述べる。

(2)は、第4章で検証する。チップ上の酸素分圧と炭酸ガス分圧を測定する方法を製作したのち、チップに封入したジャケット液の組成と得られた酸素分圧の関係性から必要な低酸素雰囲気を得る方法を見出す。

第5章で検証する(3)は、実際にマイクロ流体チップ上で細胞を低酸素培養して、低酸素に応答する蛍光プローブと挙動や性質が変わる細胞から、低酸素培養システムとしての適否を評価する。

上記の評価項目より、ジャケット液によるオンチップマルチガスインキュベーションによる酸素分圧および炭酸ガス分圧の調節方法を明らかにして、新規の低酸素培養システムを確立する。



# 第3章 低酸素細胞培養システムの製作

## 3.1. マイクロ流体チップの設計要件

本研究で製作するマイクロ流体チップは、以下の条件を満たすよう設計した。

### ① 共焦点顕微鏡での観察に使用できるチップにする

設計するマイクロ流体チップは、共焦点レーザー走査型顕微鏡(Fv-10i, Olympus, Tokyo, Japan)での観察に使用できる仕様にする。共焦点顕微鏡 Fv-10i での観察は、専用のステージホルダーに観察対象をセットして、顕微鏡ステージに配置して行う。そのため、チップの形状は、ステージホルダーにあわせる必要がある。さらに、蛍光観察を想定しているので、ガラスを使用する。

⇒チップの大きさは、縦幅 26mm×横幅 48mm のガラスとした。

### ② 共焦点顕微鏡の作動距離にあわせる

共焦点顕微鏡は、高さ方向の作動距離(ワーキングディスタンス)がおおよそ 1mm 程度と狭いため、細胞へのピン트가合わなくなることを避けるため、ガラスは厚みの薄いカバーガラスを使用して、細胞はカバーガラス上に配置するのが望ましい。ただし、強度確保のため、一般的なカバーガラスよりも厚い(0.35~0.45mm)ものを使用する。

⇒細胞は、カバーガラス上に配置して観察する。

### ③ ガス透過隔壁は、PDMS(シリコーン)製

チップ上でジャケット液と培地を隔てる培地リザーバの材料は、ポリジメチルシロキサン(PDMS)のようなガス透過性の高いシリコーンとする。逆に、ジャケットリザーバの材料は、外気との通気を防ぐため、ガスバリア性が高いものが良く、加えて、ジャケットリザーバが細胞と顕微鏡の光路にはいるため、透明な材料が良い。

⇒培地リザーバは PDMS 製、ジャケットリザーバはアクリル樹脂 (PMMA) 製とする。

### ④ マイクロ流路も PDMS (シリコーン) 製

マイクロ流体チップは、点字デバイスでマイクロ流体の送液を行う。点字デバイスによる送液は、点字ピンで流路を加圧して変形させるために、マイクロ流路の材料は、弾性体でなくてはならない。

⇒マイクロ流路は、点字ピンで加圧したマイクロ流路が変形するよう、弾性体である PDMS を材料にする。



### 3.3. 実験方法

#### 3.3.1. マイクロ流路の型の製作

マイクロ流路に用いるみぞを得るために、ガラス表面に凸形状の流路パターンがプリントされたマイクロ流路の型に液体状のシリコーンを流し込み硬化させ、型どりして成型を行った。図 3-2 と図 3-3 にそれぞれマイクロ流路の型の製作過程、製作に使用した機器と試薬を示した。まず、感光性フォトレジスト(SU-8 3035, Nippon Kayaku, Tokyo, Japan) (図 3-3a) をスピコート(3000rpm)して 30  $\mu\text{m}$  厚に薄膜形成したカバーガラス(C050701, Matsunami, Osaka, Japan)を作成した(1.)。次に、IC 用レイアウト CAD ソフト LayoutEditor で描画したマスクパターンをもとに製作した 12,700dpi フォトマスクフィルム(Unno Giken, Tokyo, Japan) を、SU-8 を被膜したガラスの上面と背面から被せた(2.)。続いて、カバーガラス上面から UV スポット光源(Photocure200, Hamamatsu, Shizuoka, Japan)(図 3-3b)を用いた直進性の UV 光による上面露光(300  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )(3.)とトランスイルミネータ(TFL-40V, UVP, CA, USA)(図 3-3c)を用いた拡散性のある UV 光による背面露光(120 $\text{mJ}/\text{cm}^2$ )(4.)を行った。酢酸 2-メトキシ-1-メチルエチル(130-10505, Wako, Osaka, Japan)(図 3-3d)を現像液に使用して現像した(5.)。現像後、カバーガラスと大型スライドガラス (S9111, Matsunami)を耐熱エポキシ系接着剤 (Duralco4460, Cotronics, NY, USA)(図 3-3e)で接着してカバーガラスの強度補強を行った(6.)。最後に、離型剤として用いるフッ素系はっ水剤(FG-5020, FluoroTechnology, Aichi, Japan)(図 3-3f)をスピコート(3000rpm)して被膜した。

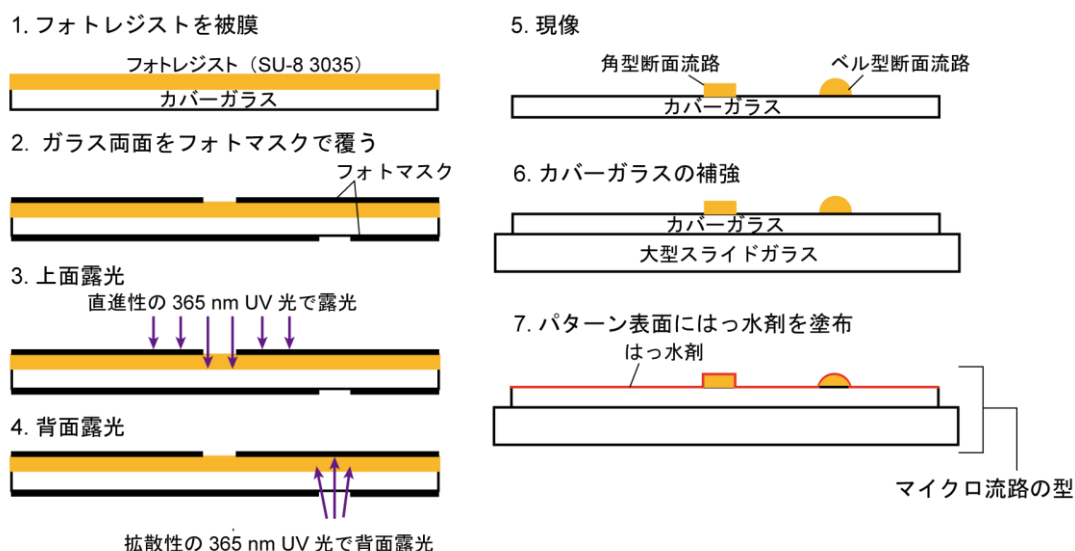
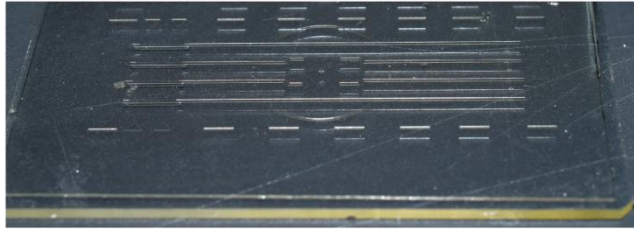


図 3-2. マイクロ流路の型の製作過程 露光に用いる UV 光の性質(直進性あるいは拡散性)は、得られるマイクロ流路の断面形状が異なる。なお、拡散性の UV 光で露光して現像した流路は、ベル型断面形状となる。



ガラス上に現像したマイクロ流路の母型  
以下の機器や試薬を使用して、図 3-1 に示した方法で製作した。



a. フォトレジスト



b. UV スポット光源



c. トランスイルミネータ



d. 酢酸 2- メトキシ-1- メチルエチル



e. 耐熱エポキシ系接着剤  
2 液混合型で硬化剤 (左) を主剤 (右)  
重量比 10:8 で混合して使用した。



f. フッ素系はっ水剤

図 3-3. 製作したマイクロ流路の型と使用した機器や試薬 製作したマイクロ流路の型の外  
観および製作に使用した試薬や機器を示した。

### 3.3.2. マイクロ流体チップの部品製作

次に、マイクロ流体チップの部品であるマイクロ流路凹層、マイクロ流路膜層、ジャケットリザーバの製作方法を述べる。(使用した機器や試薬は図 3-5 に示した。)

図 3-4A にマイクロ流路凹層の製作方法を示す。マイクロ流路凹層は、マイクロ流路の型に液状シリコンであるポリジメチルシロキサン(PDMS : Poly(dimethylsiloxane))(KE-106, Shin-Etsu, Tokyo, Japan)(図 3-5a)を 250  $\mu\text{m}$  厚にスピコートして、硬化(65 $^{\circ}\text{C}$ , 6 時間)させて製作した(1.)。型から離型した流路凹層は、マイクロ流路周囲の余剰部をトリミングした後(2.), マイクロ流路 1 ループにつき 1 つ、生検トレパン(図 3-5b)を用いて  $\phi 1 \text{ mm}$  の穴をあけて細胞培養ウェルを製作した(3.)。

マイクロ流路膜層の製作方法を図 3-4B に示す。150  $\mu\text{m}$  厚シリコンシート(Sirius, Fuso Rubber, Hiroshima, Japan)をマイクロ流路凹層が覆われるサイズに切り分けて、4 か所のマイクロ流路末端に穴の位置があうように生検トレパンで  $\phi 1.5 \text{ mm}$ (図 3-5c)の導入口および排出口を製作した。

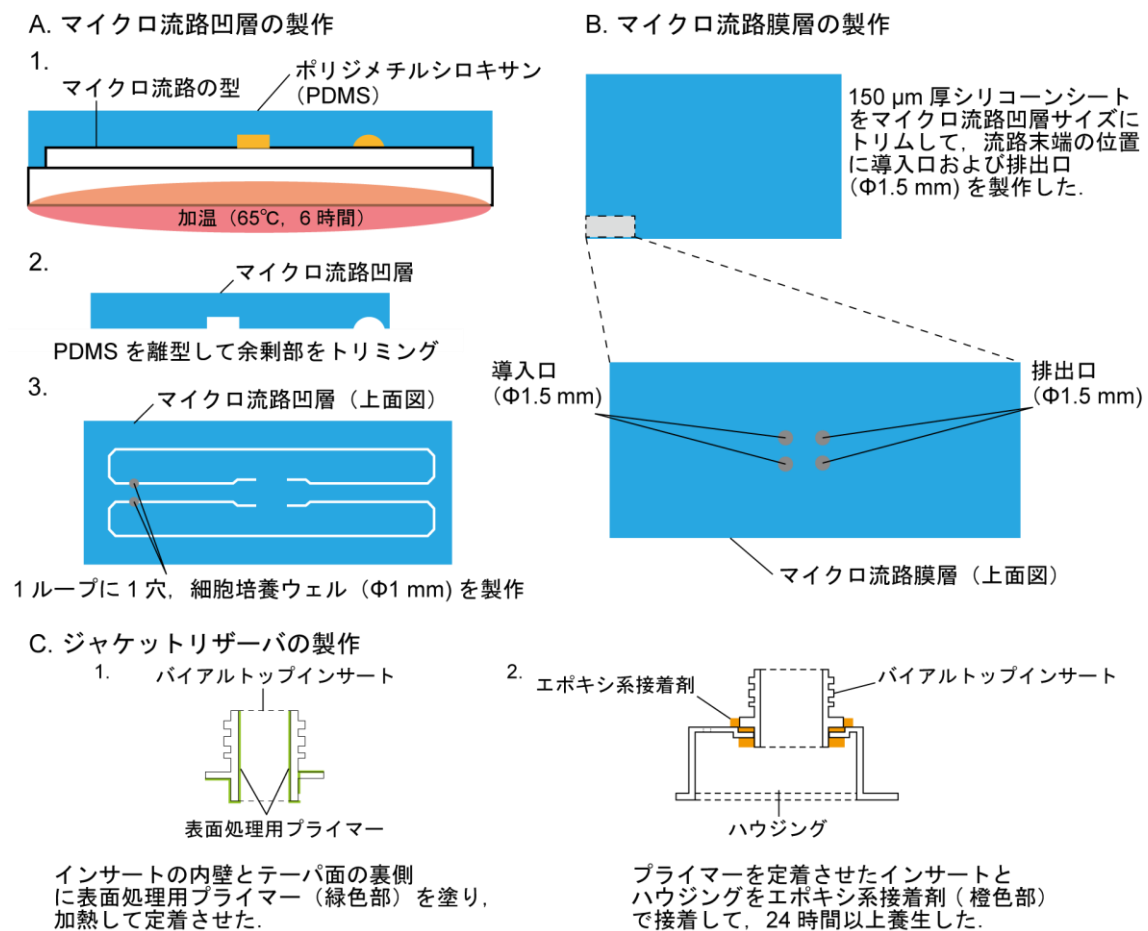


図 3-4. マイクロ流路流体チップ部品の製作方法 3 種類のマイクロ流体チップ部品の製作過程を断面図または上面図で示した。

図 3-4C のように、ジャケットリザーバは、バイアルトップインサートとジャケットリザーバを接着剤で接着して製作した。バイアルトップインサート(図 3-5d)は、PMP 製バイアル(V-30, Maruemu, Osaka, Japan)(図 3-5a)を追加加工(Kodensha, Tokyo, Japan)して製作したもので、接着強度が良くなるように、あらかじめ表面処理用プライマー(SKIP#606, Sotec, Chiba, Japan)(図 3-5e)を塗布して、工業用ドライヤーで 120℃以上に加温してインサート表面に定着させた(1.)。このプライマー処理したインサートと射出成型で製作した PMMA 製ハウジング(Proto Labs, Kanagawa, Japan)(図 3-5f)をエポキシ系接着剤(16051, Konishi, Osaka, Japan)(図 3-5g)で接着してジャケットリザーバを製作した(2.)。



図 3-5. 製作したマイクロ流路チップの各部品と使用した機器や試薬 マイクロ流路凹層, 流路膜層, ジャケットリザーバの外観と各部品に用いた機器や試薬を示した。



### 3.3.3. マイクロ流体チップの部品洗浄

マイクロ流体チップの部品のうち、培地や細胞と直接接触するものは、入念に洗浄して細胞毒性になる汚れを除去した。洗浄は、アセトン、2-プロパノールでそれぞれ超音波洗浄を行った後、精密洗浄用超高純度アルカリ洗浄液(TMSC, Tama chemicals, Kanagawa, Japan)(図 3-6a)により計3回行った。

図 3-6 上段に TMSC での洗浄に使用したセットアップおよび使用した試薬や機器を示す。超純水で希釈した 1%(v/v) TMSC 水溶液 500ml を入れたビーカーを加温源付きのマグネティックスターラーで 55°C に加温しながら攪拌して、この洗浄液にチップの部品を浸漬して 10 分間洗浄した。

洗浄するチップの部品は、3.3.2 で製作したマイクロ流路凹層とマイクロ流路膜層、プライマー塗布前のバイアルトップインサート、加えて、PDMS 製筒(外径 12 mm, 内径 10 mm, 高さ 15 mm, Kyowa Industrial, Nigata, Japan)(図 3-6b)と 26×48 mm カバーガラス(thickness No.4, Matsunami, Osaka, Japan)の計 5 点である。TMSC による洗浄後は、超純水 1L に 3 度浸漬して後洗浄を行い、定温乾燥器(図 3-6c)で十分に乾燥させた。

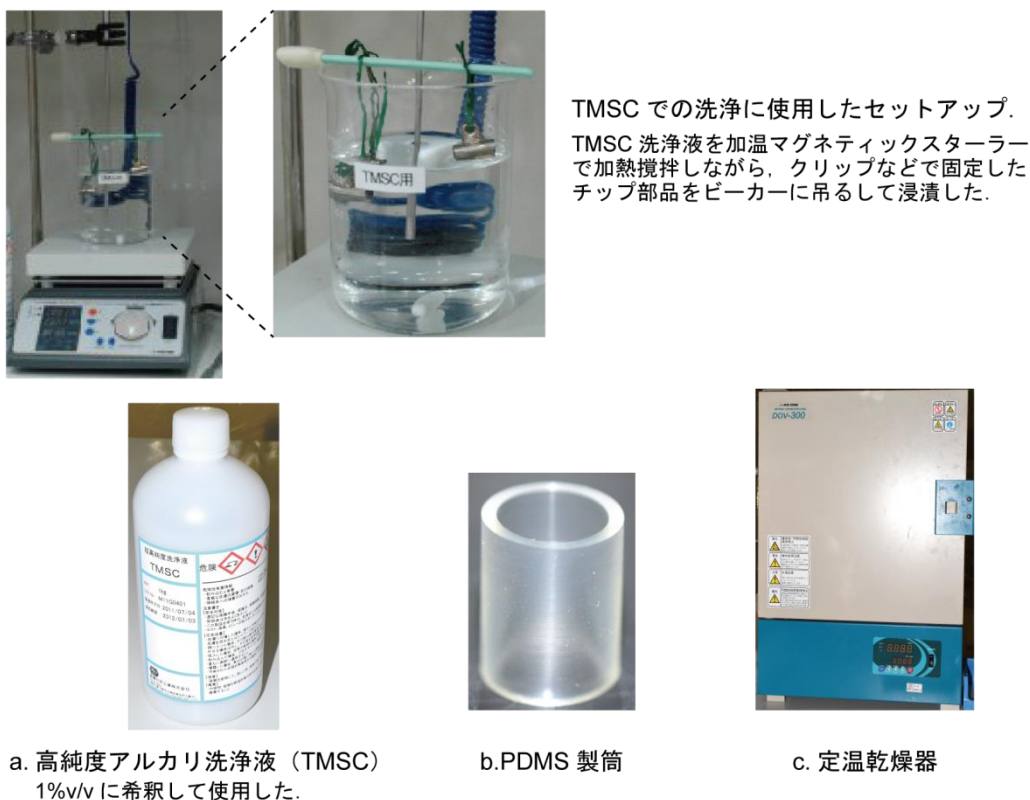


図 3-6. マイクロ流体チップ部品の洗浄セットアップと使用した試薬や機器 TMSC による部品洗浄に使用したセットアップと使用した試薬や機器の外観を示した。

### 3.3.4. マイクロ流体チップの組み立て

マイクロ流体チップの部品製作と洗浄を経て、クリーンブース内でマイクロ流体チップの組み立てを行った。マイクロ流体チップの組み立てる過程は、4つに分けられる(図 3-7)。

まず、マイクロ流路凹層とマイクロ流路膜層を接合してマイクロ流路層を製作した(1.)。流路凹層と膜層の接合面を真空プラズマ装置(YHS-R, SAKIGAKE, Kyoto, Japan)(図 3-8a)で親水化処理(20 mA, 20 Pa, 45 s)して接合した。流路凹層の凹面を膜層で覆うことでマイクロ流路が形成された。なお、使用した機器や試薬は図 3-8 に示した。

次に、マイクロ流路層をカバーガラスに接合した(2.)。マイクロ流路層と 26×48 mm カバーガラスの接合面を、同様に親水化処理して接合した。

続いて、マイクロ流路層にカバーガラスと PDMS 製筒を接合してマイクロ流体チップ基底部を製作した(3.)。マイクロ流路層と PDMS 製筒、12×12 mm カバーガラス(No.4, Matsunami)の接合面を同様に親水化処理して、PDMS 製筒は流路層の導入口と排出口を囲う様に、カバーガラスはマイクロ流路を覆う様に接合した。このカバーガラスは、ジャケット液による流路膜層を介した酸素吸収が過剰に起きることを防止するために用いた。

最後に、ジャケットリザーバをマイクロ流体チップ基底部に接着してマイクロ流体チップを製作した(4.)。ディスペンサ(Super  $\Sigma$  X-V7, Musashi Engineering, Tokyo, Japan)(図 3-8b)を用いてジャケットリザーバ底部にシリコーン系接着剤(AX-041, Cemedine, Tokyo, Japan)(図 3-8c)を塗布してチップ基底部に接着し、24 時間以上養生した。

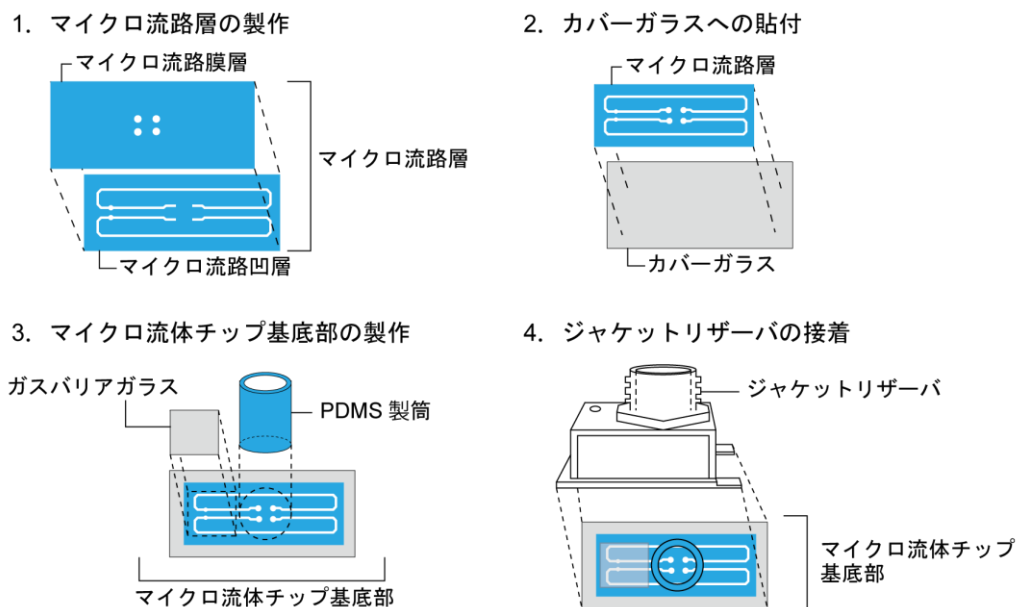
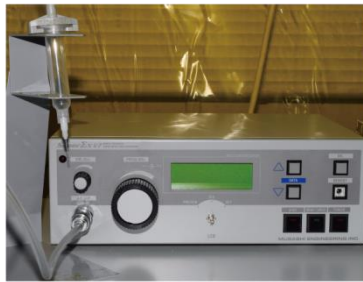


図 3-7. マイクロ流路流体チップの組み立て方法 マイクロ流体チップの製作過程を模式図で示した。





a. 真空プラズマ装置



b. 液体定量吐出装置（ディスペンサ）



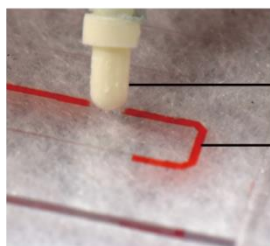
c. シリコン系接着剤

図3-8. マイクロ流路チップの組み立てに使用した機器や試薬 マイクロ流体チップの組み立てに使用した試薬や機器の外観を示した.

### 3.3.5. マイクロ流体チップの使用準備

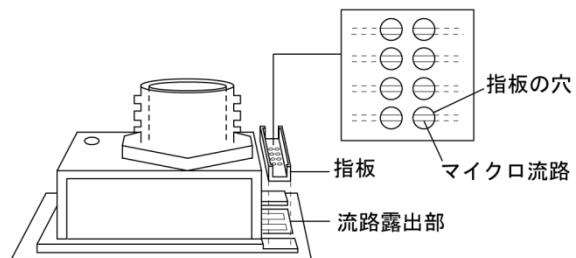
マイクロ流体チップを使用する準備として、マイクロ流路内を水に溶解しやすい炭酸ガスに置換してから超純水で満たしたのち、点字セルを装着するための指板を取り付けた。図3-9にマイクロ流路へ液体導入と指板の接着方法、使用した部品や機器の外観を示した。

チップを真空デシケータ(図3-9a)に入れて10分間真空引きしてから炭酸ガスを導入して30分おき、チップ内の空気を炭酸ガスに置換した。デシケータから取り出したチップは、ただちに培地リザーバとジャケットリザーバを超純水で満たし、スクリューキャップ(図3-9b)で培地リザーバにフタをした。

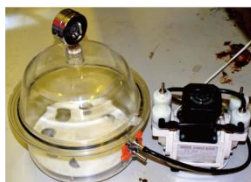


点字ピンの先端  
流路に導入した滅菌水

点字ピンによる流路への液体導入  
写真では、可視化のため染色水を使用した。



マイクロ流体チップへの指板の接着  
指板の穴の中央を流路が通るように位置を合わせた。



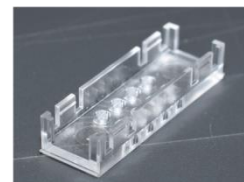
a. 真空デシケータ



b. スクリューキャップ



c. 点字ピン



d. 指板

図3-9. マイクロ流路チップを使用する準備 マイクロ流路への液体導入と指板の接着を行った。また、使用したチップの部品や機器の外観を示した。

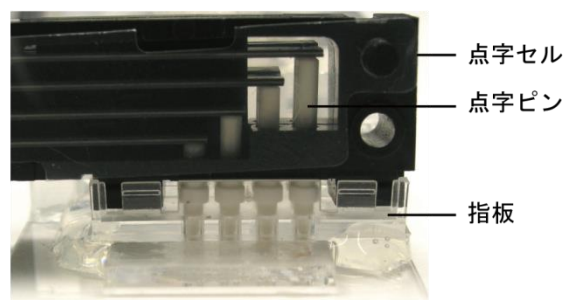
マイクロ流路への超純水の導入は、点字ピン(図 3-9c)を使用して人の手で行う。具体的には、図 3-9 左上に示すように点字ピンの先端でチップの流路露出部を優しくなぞるように加圧して流路に超純水を導いた。

プライミング後、マイクロ流体チップの流路露出部の流路に対して、指板にあいた穴が重なるように位置合わせして、エポキシ系接着剤(16051, Konishi)で指板(図 3-8d)を接着して6時間以上養生した。

### 3.3.6. 低酸素細胞培養システムの構築

使用準備の整ったマイクロ流体チップに点字デバイスを装着し、サーモプレートに配置して低酸素細胞培養システムのセットアップを構築した。

図 3-9 にチップに点字デバイスを装着した外観とセットアップの構築に使用した機器を示す。8本の点字ピンが格納された点字セル(図 3-10a)をチップに装着して、ハーネス(図 3-10b)で点字デバイス本体(図 3-10c)に接続した。点字を装着したチップは、サーモプレート(TP-W, Tokai Hit, Shizuoka, Japan)(図 3-10d)上に配置して 37°Cで加温した。



チップに取りつけた指板に点字セルと装着した外観。



図 3-10. 低酸素細胞培養システムの構築 指板に点字セルを装着した箇所の外観および培養システムの構築に使用した機器を示した。

## 3.4. 結果

### 3.4.1. マイクロ流体チップ

製作したマイクロ流体チップの分解図と外観を図 3-11 に示す。マイクロ流体チップは、分解図(A)に示すように、下からカバーガラス、マイクロ流路層、ガスバリアガラス、PDMS 製筒、ジャケットリザーバ、指板で構成される。マイクロ流路層は、シリコーンであるポリジメチルシロキサン(PDMS : Poly(dimethylsiloxane))製で、特に流路膜層は、点字デバイスで駆動するためシリコーンのような弾性体である必要があり、ガラスバリアガラスは、マイクロ流路層が PDMS 製であることからジャケット液とのガス交換を防ぐために用いた。PDMS 製筒は、マイクロ流路の導入口と排出口を囲うように配置して培地を入れる培地リザーバになる。ジャケット液とのガス交換するため、ガス透過性の高い材質でなくてはならない。ジャケットリザーバは、培地リザーバの周囲を囲い、マイクロ流路層を覆うよう配置して、ジャケット液を封入する。指板は、点字デバイス装着のためのアタッチメントである。

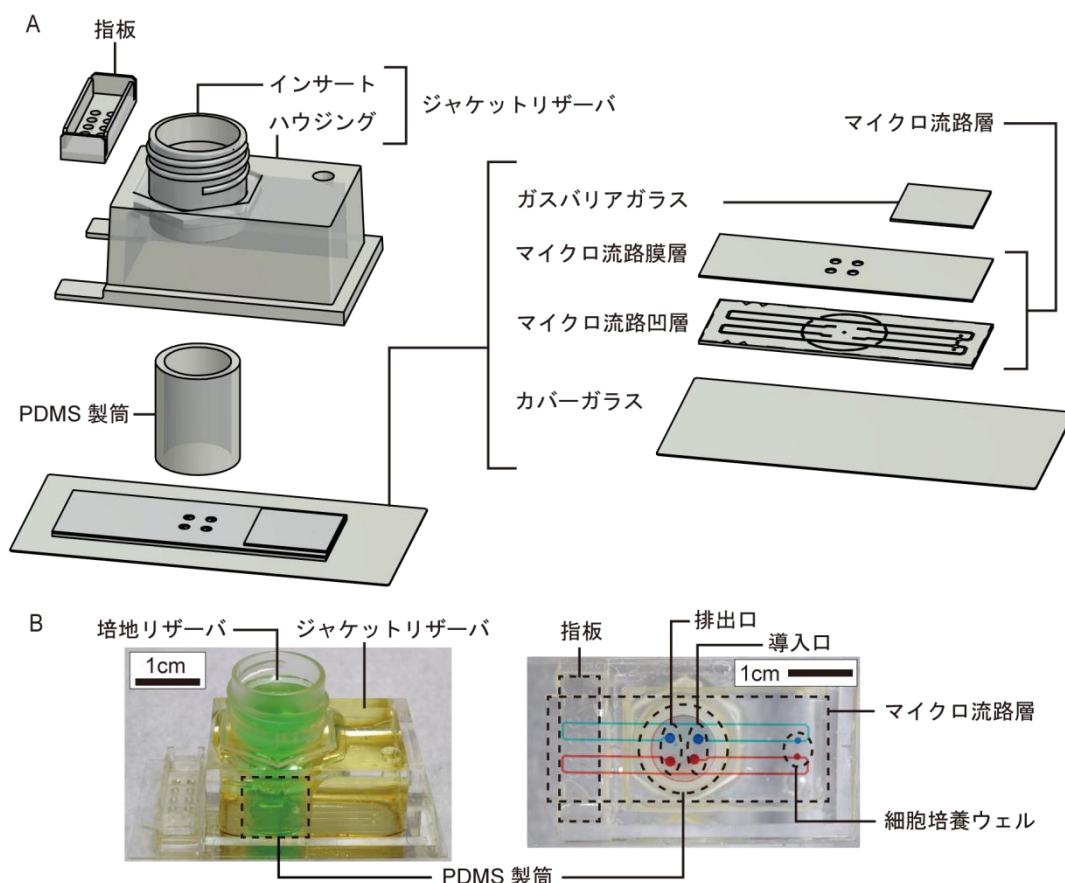


図 3-11. 製作したマイクロ流体チップ マイクロ流体チップの分解図(A)とチップ側面および底面の外観(B)を示した。

マイクロ流体チップの側面および底面からの外観(B)を示した。側面図では、チップの培地リザーバとジャケットリザーバに、それぞれ緑色、黄色の染色水を入れた。それぞれのリザーバに入れた液体は、PDMS 隔膜を介して接触した状態となる。他方、底面図では、マイクロ流路に 2 色の染色水を導入して色分けして示した。マイクロ流路は独立した同じパターンを 2 系統もち、それぞれの系統に対して異なる溶液を流すこともできる。流路へのアクセスは、培地リザーバ底面の導入口から行う。導入口は、マイクロ流路膜層にあけた穴( $\phi 1.5$  mm)のうち、マイクロ流路上にある細胞培養ウェル( $\phi 1$  mm)に近い側の穴である。なお、指板を接着した箇所の流路は、点字ピンで加圧できるようにベル型断面形状となっている。

### 3.4.2. 低酸素細胞培養システム

低酸素細胞培養システムのセットアップを図 3-12 に示す。培養システムは、細胞の培養容器であるマイクロ流体チップ、マイクロ液体のポンプである点字セルと点字デバイス、チップを  $37^{\circ}\text{C}$  に温める加温源であるサーモプレートで構成される。セットアップ  $10 \times 15$  cm のサーモプレート上におさまる小型の培養系である。

この培養システムの運用は、点字セルを装着したチップにクリーンベンチ内で細胞を播種する。その後、希望する培養雰囲気に応じて調製したジャケット液をチップに封入して、サーモプレートで加温することで培養を実施する。

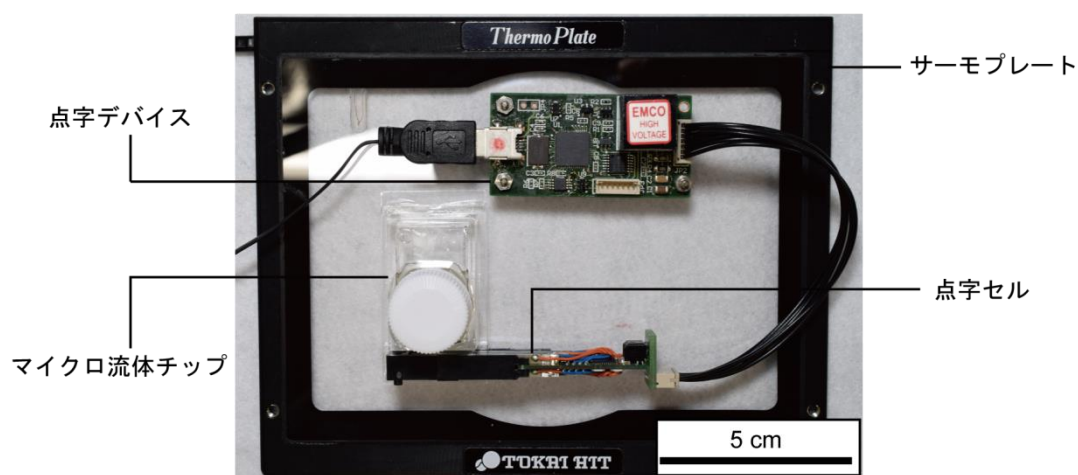


図 3-12. 低酸素細胞培養システムのセットアップ マイクロ流体チップ，点字セルと接続した点字デバイス，サーモプレートで構成される培養システムの外観を示した。

### 3.5. 第3章まとめ

第3章では、マイクロ流体チップの製作方法の確立と低酸素細胞培養システムのセットアップの確立を目的として、実際にチップと培養システムを製作したことで達成した。製作したチップは、設計意図どおりに組み立てられたと考える。

ここで、今回製作したマイクロ流体チップ（低酸素培養チップ）と以前製作したマイクロ流体チップ（長期培養チップ）を比較した図3-13を示す。以前のものにくらべ、低酸素培養チップは、培地リザーバのねじ口の開口が大きくなり、培地リザーバ内へのアクセスが容易になった。見た目以外では、気密性が向上し、チップ1個あたりの材料費も半額以下に抑えられた。

考察として、部品に付着した研磨剤残渣などの残留物に留意したことが良かったと考えている。たとえば、付着残留物の除去は、以前はアセトン、IPA洗浄のみだったが、今回は、アセトン、IPA、超音波で洗浄した上でさらにアルカリ洗浄液(TMSC)での洗浄まで行うほどに、徹底的に洗浄を行った。これが功を奏したのかチップの不良品率は3割ほど低下している。今後は、細胞毒性についても留意していきたい。というのも、接着剤やシリコーンは、硬化する際に生じるガスがあり、例えばシリコーンは、硬化する仕組みが付加型と縮合型で異なり、縮合型だと硬化するときにアルコールや酢酸が発生する。これらのガスが細胞に対して毒性をもつ可能性がある。使用する接着剤やシリコーンについては使用前に硬化機序を把握することに努め、ガスが発生するもの使用は代替品を選定するなどして対策したい。

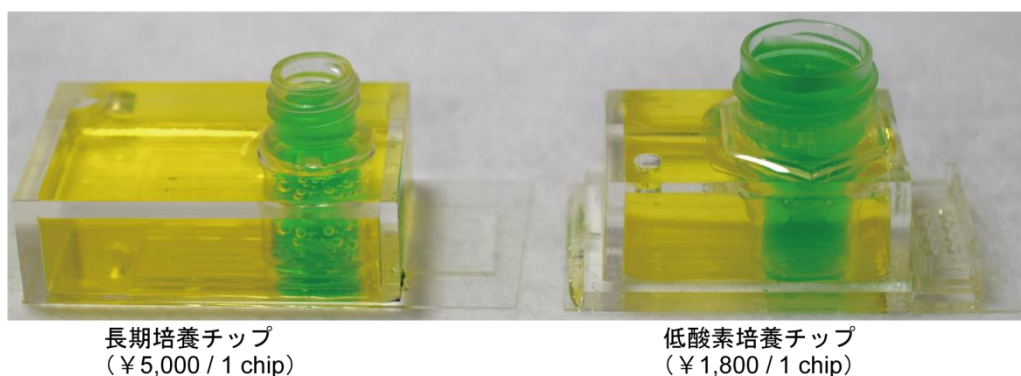


図3-13. マイクロ流体チップの比較 以前製作したチップ（左）と今回使用する低酸素培養チップ（右）を並べて示した。

まとめると、以前製作した長期培養チップから、特に部品や材料の洗浄を見直し、低コストかつ不良品の割合が低い製作方法を確立した。以上より、チップおよび低酸素培養システムのセットアップ構築を達成したことで、製作したチップ上の酸素分圧および炭酸ガス分圧を測定できる準備が整った。



# 第4章 オンチップマルチガスインキュベーションの評価

## 4.1. 背景

本章では，製作した低酸素細胞培養システムの機能評価のため，マイクロ流体チップの培地リザーバ内の酸素分圧( $pO_2$ : partial  $O_2$  pressure)と炭酸ガス分圧( $pCO_2$ : partial  $CO_2$  pressure)を測定して，培養システムで低酸素培養が実施できるかを検証する．具体的には，チップに封入するジャケット液の組成検討を行い，ジャケット液によるオンチップマルチガスインキュベーション(OCMI: On-chip multi-gas incubation)を利用した  $pO_2$  および  $pCO_2$  の制御範囲を測定して検証する．ジャケット液は，炭酸ガス供給源として炭酸水素ナトリウム( $NaHCO_3$ )と炭酸ナトリウム( $Na_2CO_3$ )，酸素吸収源としてアスコルビン酸ナトリウム( $NaHAsc$ )を超純水に溶解して調製するため，この3種類の試薬濃度の組み合わせよりチップ上の  $pO_2$  および  $pCO_2$  が制御される．より具体的なジャケット液の組成検討は，まず  $NaHCO_3$  と  $Na_2CO_3$  の2種類の試薬濃度の組み合わせから  $pCO_2$  を5%に維持するジャケット液組成を検討する．その後，様々な濃度の  $NaHAsc$  を加えて5%  $pCO_2$  を維持しながら  $pO_2$  を測定する，なお，5%  $pCO_2$  は，生物系ラボでの炭酸ガス緩衝培地を使用した細胞培養において，一般的に使用される  $pCO_2$  である．最終的には，測定より得られた  $pO_2$  とジャケット液の  $NaHAsc$  濃度の関係をグラフにまとめて，ユーザーが希望する  $pO_2$  となるジャケット液組成を容易に把握する方法を提供して，開発した培養システムの運用方法の確立を目指す．さらに，チップ上の  $pO_2$  および  $pCO_2$  は，一定値の安定した状態の維持が望ましいことから，OCMIによる調節が時間変化に関わらず，継続的かつ安定した状態を維持するのもかも，評価の対象とする．

チップ上の  $pO_2$  測定は，市販の光学式酸素センサを組み込んだ測定セットアップを設計，製作して行う．酸素センサは，Optosirius社 NeoFox 酸素センサーシステムと RedEye 酸素センサーパッチを使用する．このセンサーシステムは，特定の発光体が発する蛍光が酸素分圧に応じて減少や消光する蛍光消光現象[28]を利用したもので，センサーパッチ表面にコーティングされたルテニウム化合物に光学プローブからの青色 LED 光を照射して励起した蛍光の強度より  $pO_2$  を測定する．

実際にチップの  $pO_2$  を測定する際は，チップを加熱しながらの測定が望ましい．そこで，培地リザーバ底部に RedEye を貼りつけたチップを盤面が透明なサーモプレート上に配置して，更に光学プローブをサーモプレートの背面に配置し，青色 LED 光をサーモプレートの裏側から RedEye に照射するようなセットアップが求められる．よって，光学プローブとチップ，チップを加熱するサーモプレートを位置合わせして配置するジグベースを製作して  $pO_2$  測定セットアップを構築した後， $pO_2$  測定を実施する．

他方,  $p\text{CO}_2$  を測定する実験方法は, 以前に確立した方法[20]で行う. 培地リザーバ内に入れてインキュベーションした  $\text{NaHCO}_3$  水溶液の  $\text{pH}$  と液温を測定して, 得られた値から  $p\text{CO}_2$  を算出した. この方法は,  $p\text{CO}_2$  電極[29]の原理に基づくもので,  $p\text{CO}_2$  に対しての  $\text{pH}$  変化が極大化する  $10 \text{ mM NaHCO}_3$  水溶液[29]の  $\text{pH}$  と温度を測定する. 培地リザーバが  $1 \text{ atm}$  であり, 培地リザーバ内の  $\text{CO}_2$ (気相)と  $\text{CO}_2$ (液相)が平衡であるとした場合, 培地リザーバ内の  $p\text{CO}_2$  は, 以下の式から算出できる.

$$p\text{CO}_2 = \frac{A_{\text{Na}}}{K_{\text{H}} \cdot 10^{\text{pH}-\text{p}K_1}} \quad (1)$$

$A_{\text{Na}}$  は, 全ナトリウムイオンであり, この  $p\text{CO}_2$  測定においては,  $\text{NaHCO}_3$  水溶液の濃度(=  $10 \text{ mM}$ )に等しい.  $K_{\text{H}}$  は,  $\text{CO}_2$ (気相)のヘンリー定数であり,  $K_1$  は, 炭酸の第一解離定数を示す.  $K_1$ ,  $K_{\text{H}}$  は, 実測値から, 以下の式のような式で求められる. [30]

$$-\log K_1 = -356.3094 - 0.06091964T + \frac{21834.37}{T} + 126.8339 \log T - \frac{1684915}{T^2} \quad (2)$$

$$\log K_{\text{H}} = 108.3865 + 0.01985076T - \frac{6919.53}{T} - 40.4515 \log T + \frac{669365}{T^2} \quad (3)$$

$T$  は, 温度を示す. よって,  $p\text{CO}_2$  は,  $10 \text{ mM NaHCO}_3$  水溶液の  $\text{pH}$  と温度の測定値をもとに, (1) - (3)式から算出する. 実際に  $p\text{CO}_2$  を測定する際は, ジャケット液を封入したチップをサーモプレート上でインキュベーションしながら, チップ内部の  $10 \text{ mM NaHCO}_3$  水溶液に  $\text{pH}$  電極をつけて  $\text{pH}$  と液温の測定を行う.

本章では, 単に製作したマイクロ流体チップの  $p\text{O}_2$  と  $p\text{CO}_2$  を実測して機能評価を行うだけでなく, このチップが煩雑な制御や大がかりな機器を使用せず, ジャケット液の調製だけでジャケット液組成に応じた培養雰囲気を得られる特徴を最大限に利用する方策として, 希望する低酸素を実現するジャケット組成を容易に把握する方法も検証する.

## 4.2. 目的

マイクロ流体チップの  $p\text{O}_2$  および  $p\text{CO}_2$  を実測して, チップ上が  $5\% p\text{CO}_2$  のときの調節できる  $p\text{O}_2$  範囲とチップに封入するジャケット液の組成検討を行う. これより, 任意の  $p\text{O}_2$  で低酸素培養するジャケット液組成の設定方法を決める.

## 4.3. 実験方法

### 4.3.1. pO<sub>2</sub> 測定セットアップの構築

3次元コンピュータ支援設計ソフト(Geomagic Design, 3D Systems, NC, USA)を用いて設計したジグベースは、黒色 ABS 樹脂を材料にして切削加工で製作(Kodensha, Tokyo, Japan)した。ジグベースに光学プローブ(RE-BIFBORO-2, Ocean Optics, FL, USA)とサーモプレート(TP-W, Tokai Hit, Shizuoka, Japan), 45° 直角反射プリズム(RPB3-10-550, Sigma koki, Tokyo, Japan)を固定した。pO<sub>2</sub> 測定に使用するマイクロ流体チップとして、マイクロ流路のないモックチップを製作して、培地リザーバ底面に酸素センシングパッチ(RedEye, Ocean Optics)を貼りつけて使用した。このマイクロ流体チップは、RedEye がプリズムの直上にくるようにサーモプレート上に配置してポリイミドテープで固定した。RE-BIFBORO-2 と接続した酸素センサーシステム(NeoFox, Ocean Optics)を PC に USB 接続することで、PC 上で pO<sub>2</sub> の測定状況のモニタリングと記録を行った。

### 4.3.2. ジャケット液の調製と封入

ジャケット液は、組成に応じて NaHCO<sub>3</sub>(S5761-500G, Sigma, MO, USA), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(196-01595, Wako, Tokyo, Japan), NaHAsc(58049-17, Kanto chemical, Tokyo, Japan)を超純水に入れて、マグネティックスターラーで攪拌して調製した。調製したジャケット液は、プラスチックニードル(NISHIKA Spin, Nippon Shika Yakuhin, Yamaguchi, Japan)を先端につけた 10 ml シリンジにとり、ジャケットリザーバの注入口から気泡が混入しないよう注いで、注入口をポリイミドテープで封止した。

### 4.3.3. マイクロ流体チップの pO<sub>2</sub> 測定

まず、pO<sub>2</sub> 測定前に酸素センサの校正として、大気酸素 (21%) と酸素なし (0%) の 2 点校正を行った。大気酸素は、培地リザーバ内に混合ガス(21% O<sub>2</sub> - 79% N<sub>2</sub>)を十分バブリングした超純水を 1.5 ml 入れて校正した。酸素なしは、飽和亜硫酸ナトリウム水溶液を 1.5 ml 入れて校正した。校正後、培地リザーバ内を超純水で洗浄して、培地リザーバ内に 21% O<sub>2</sub> ガスをバブリングした超純水 1.5 ml を入れ、ジャケットリザーバにはジャケット液を封入した。続いて、NeoFox と USB 接続した PC から 10 分毎に培地リザーバ内の pO<sub>2</sub> を記録した。加えて、Windows 上のマウス操作を記録して自動化するフリーソフト UWSC を利用して、光学プローブが pO<sub>2</sub> を記録する 3 分前から記録後まで点灯した後、消灯するように制御を行った。最後に、10 分毎に 3 日間、測定と記録した pO<sub>2</sub> の平均値(n=3)を求めて、pO<sub>2</sub> の時間変化をグラフ化した。



#### 4.3.4. マイクロ流体チップの pCO<sub>2</sub> 測定

第一に pH 計(TPX-999i, Toko, Tokyo, Japan)と pH 電極(PCE103CSW-SR, Toko)の校正を行った。中性りん酸塩 pH 標準液(pH-7S, Toko), フタル酸塩 pH 標準液(pH-4S, Toko), ほう酸塩 pH 標準液(pH-9S, Toko)で 3 点校正を行った。続いて, 調製した 10 mM NaHCO<sub>3</sub> 水溶液を培地リザーバに 1.5 ml 入れて, pH と液温を測定して記録した。記録後は, ジャケットリザーバにジャケット液を封入して, チップをサーモプレート(FTP-28190, As one, Osaka, Japan)上に配置してインキュベーションを開始した。1 日毎に 7 日間, 測定と記録した 10 mM NaHCO<sub>3</sub> 水溶液の pH と液温から, pCO<sub>2</sub> を算出した。最後に, pCO<sub>2</sub> の平均値(n=3)を求めて, ジャケット組成毎の pCO<sub>2</sub> の時間変化をグラフにした。

### 4.4. 結果と考察

#### 4.4.1. pO<sub>2</sub> の測定セットアップ

図 4-1 に, マイクロ流体チップの pO<sub>2</sub> 測定セットアップの外観と模式図を示した。

セットアップは, 治具ベースに反射プリズムと光学プローブ, サーモプレートを取りつけた。光学プローブ, 酸素センサ本体である NeoFox に接続して, NeoFox は制御用 PC に USB で接続した。pO<sub>2</sub> 測定に使用するチップは, 培地リザーバ底面に酸素プローブを貼ったマイクロ流路のないモックチップである。このチップは, プリズム直上の 37°C に加温したサーモプレートの上に固定した。このセットアップを用いて, チップの培地リザーバ内の pO<sub>2</sub> を測定した。

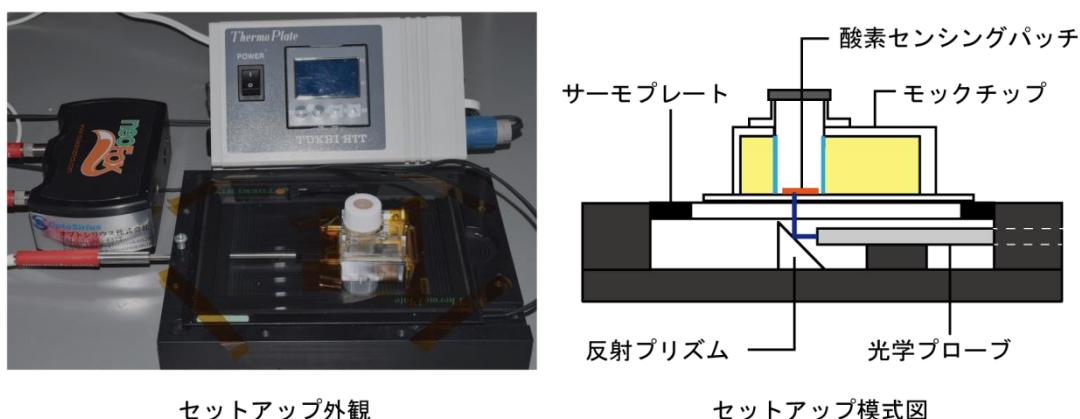


図 4-1. 酸素分圧(pO<sub>2</sub>)測定セットアップ セットアップの外観と模式図を示した。

#### 4.4.2. pO<sub>2</sub> 測定

異なる NaHAsc 濃度のジャケット液を封入したマイクロ流体チップを3日間インキュベーションした pO<sub>2</sub> の時間変化を測定した結果を図 4-2 に示す。

インキュベーションした3日間にわたり10分毎に測定した pO<sub>2</sub> の平均値と標準偏差をとったところ、0 M, 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M NaHAsc でそれぞれ 20.68±0.19%, 14.58±0.13%, 9.49±0.28%, 4.89±0.26% となり、NaHAsc 濃度を変更することで pO<sub>2</sub> を約 5-21% の範囲に調節できることが示された。これより、ジャケット液に含まれる NaHAsc がジャケットリザーバと培地リザーバの PDMS 隔膜を介して培地リザーバ内の酸素を吸収すること、および、酸素吸収量が NaHAsc 濃度に比例することが確かめられた。

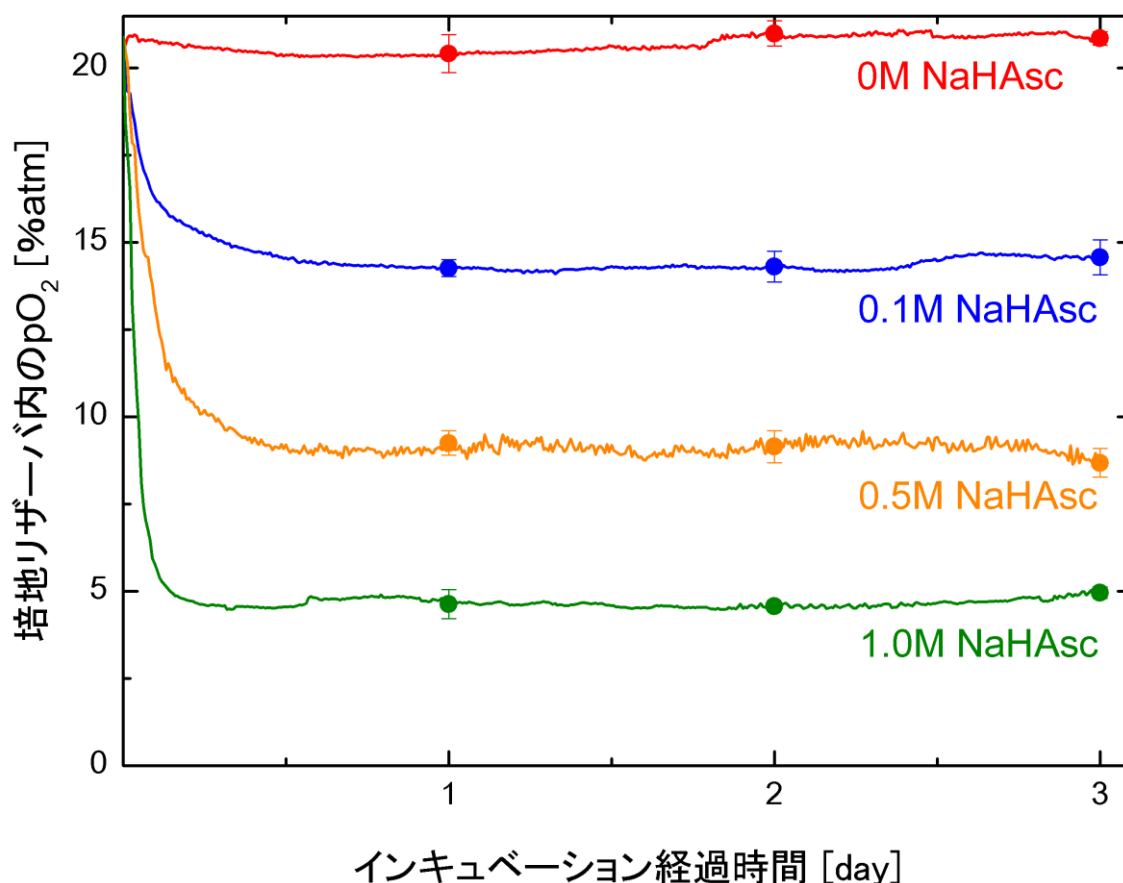


図 4-2. 酸素分圧の時間変化 縦軸に培地リザーバ内の酸素分圧(pO<sub>2</sub>), 横軸にインキュベーションの経過時間をとった。図中の NaHAsc 濃度は、0.8M NaHCO<sub>3</sub> - 65mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 水溶液に溶解したアスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)の濃度である。pO<sub>2</sub> の測定値は、1 日毎に平均値と偏差(n=3, ±SD)をプロットした。

インキュベーション開始後、いずれのジャケット液でも  $pO_2$  は、約3時間程度で安定した値に落ち着き、その後3日間の  $pO_2$  変化および測定誤差が $\pm 0.5\%$ 以内におさまった。よって、 $pO_2$  は、ほぼ一定値に維持されたといえる。

NaHAsc 濃度と  $pO_2$  の関係は、少なくとも3日間はほぼ変動しないと考えられることから、得られた  $pO_2$  と必要な NaHAsc 濃度を図 4-3 に示した。この図は、インキュベーション1日後の  $pO_2$  の値をプロットし、その時の NaHAsc 濃度との関係をグラフに示した。このグラフから、任意の  $pO_2$  を得る際に、ジャケット液に溶かす NaHAsc 濃度が読み取れる。つまり、このチップを使って必要とする  $pO_2$  値で培養する際のジャケット液組成の NaHAsc 濃度が求められることになる。

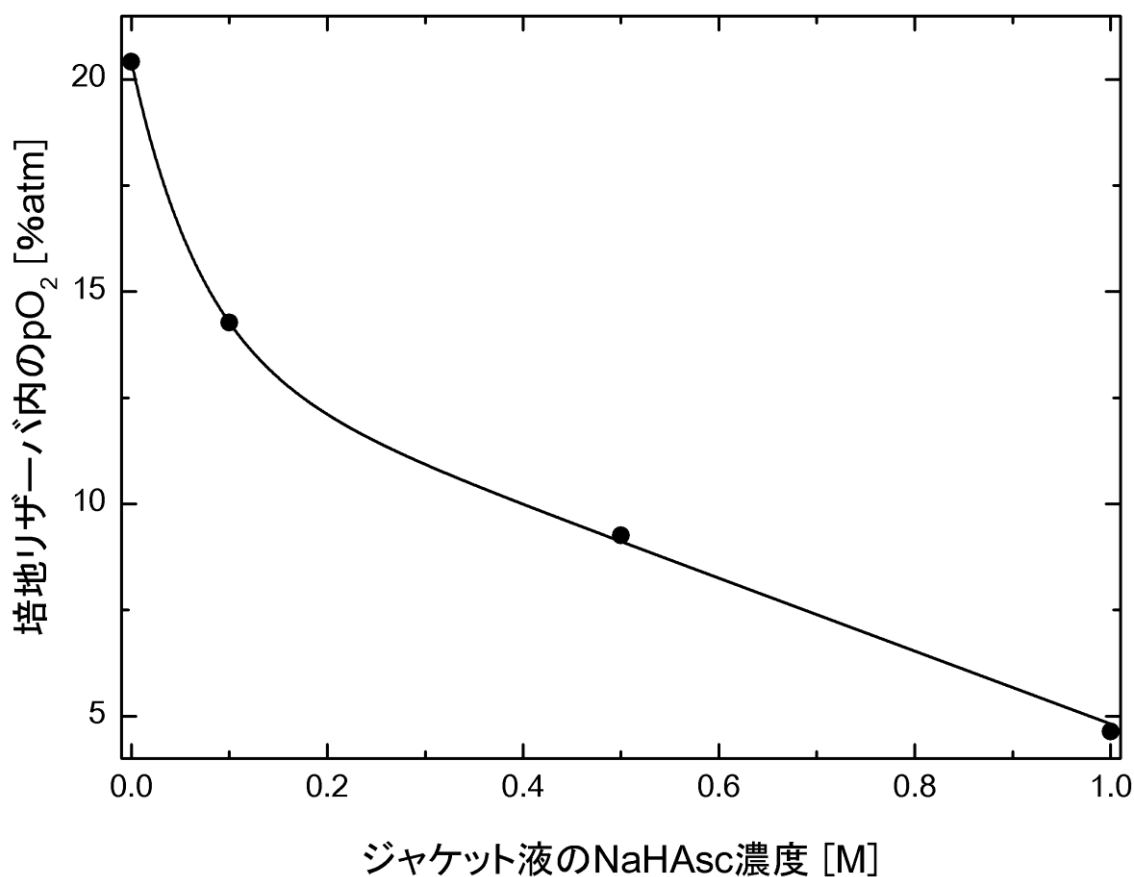


図 4-3. 酸素分圧とアスコルビン酸ナトリウム濃度の関係 縦軸に培地リザーバー内の酸素分圧( $pO_2$ )、横軸にジャケット液中のアスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)濃度をとった。各 NaHAsc 濃度における1日経過後の  $pO_2$ (図 4-2 参照)をプロットして、指数関数のカーブフィッティングした曲線をひいた。

#### 4.4.3. NaHCO<sub>3</sub> と Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> で調製したジャケット液の pCO<sub>2</sub>

任意の pO<sub>2</sub> を設定するために必要な NaHAsc 濃度を導き出す関係が図 4-3 で得られたので、次に、5% pCO<sub>2</sub> を設定するためのジャケット液組成を検討する。まず、NaHCO<sub>3</sub> のみで調製したジャケット液から PDMS 隔壁を透過して放出される CO<sub>2</sub> によって、培地リザーバ内の pCO<sub>2</sub> を 5% にするために必要な NaHCO<sub>3</sub> 濃度を調べた。NaHCO<sub>3</sub> 濃度を 0-1.0 M の範囲にて 0.2 M 間隔で調製したジャケット液で 7 日間インキュベーションして、インキュベーション 1 日後と 7 日後の pH と液温を測定して、それらの値から pCO<sub>2</sub> を算出した。

この結果、図 4-4 に示すように、pCO<sub>2</sub> は、ジャケット液に含まれる NaHCO<sub>3</sub> 濃度が増えるにつれ上昇するが、時間経過で減少する。これは、ジャケット液から発生する炭酸ガスがジャケットリザーバと培地リザーバの PDMS 隔壁を透過して、培地リザーバ内に供給されたが、やがて供給される炭酸ガスが減少したと考えられる。しかし、近似直線によると 0.8 M NaHCO<sub>3</sub> 以上では、7 日後も pCO<sub>2</sub> は 5% 以上で必要条件を満たしていたため、これ以降での検討時の NaHCO<sub>3</sub> 濃度は、0.8 M とした。

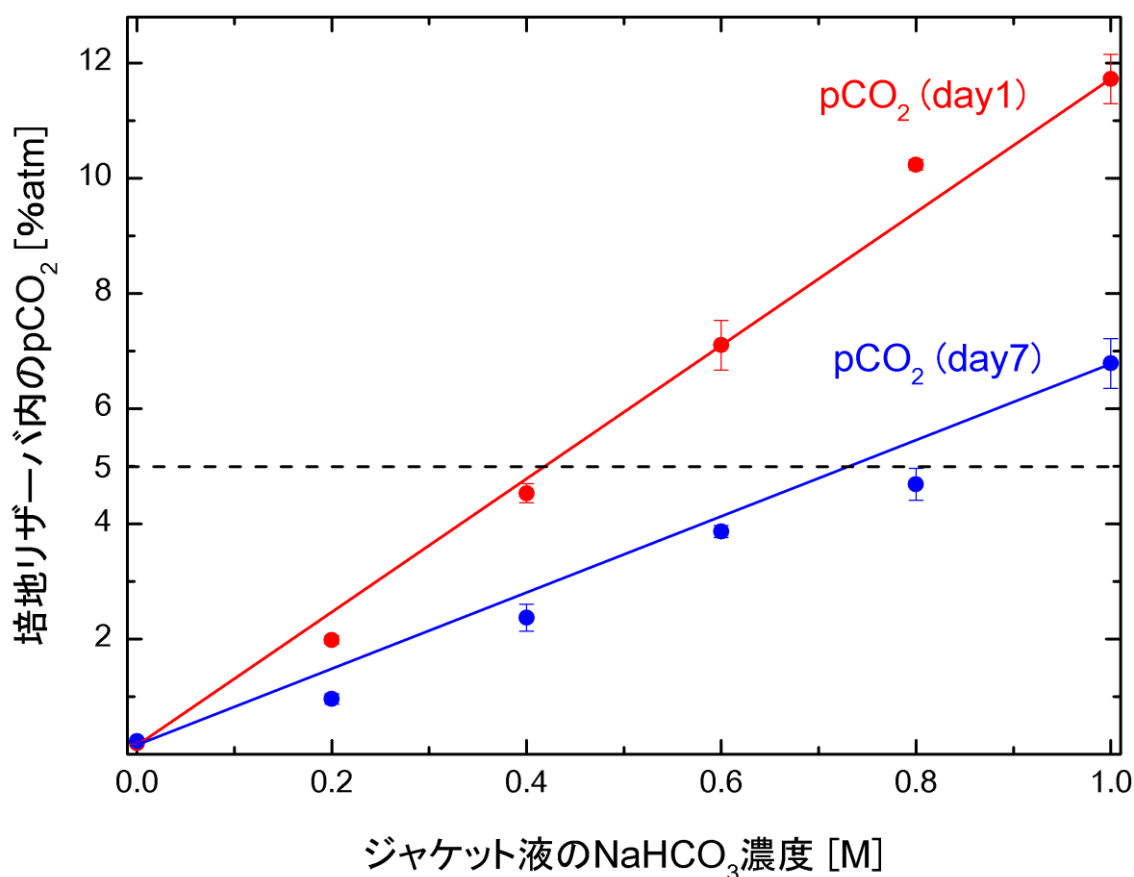


図 4-4. 炭酸ガス分圧と炭酸水素ナトリウム濃度の関係 縦軸に培地リザーバ内の炭酸ガス分圧(pCO<sub>2</sub>)、横軸にジャケット液中の炭酸水素ナトリウム(NaHCO<sub>3</sub>)濃度をとった。各 NaHAsc 濃度での 1 日後と 7 日後における pCO<sub>2</sub> の平均値および標準偏差(n=3, ±SD)をプロットして、近似直線をひいた。破線は、5% pCO<sub>2</sub> を示す。

pCO<sub>2</sub> が 5%以上の CO<sub>2</sub> 供給を満たす NaHCO<sub>3</sub> 濃度は 0.8 M と設定したが、pCO<sub>2</sub> は経時変化し、安定した調節が実施できないことが確かめられた。そこで、以前の長期培養のときにも実施した方法である NaHCO<sub>3</sub> に低濃度の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて、炭酸水素イオン(HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>)を炭酸イオン(CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>)で緩衝して、炭酸ガスの発生を穏和にすることで安定した調節が実現するか検証した。

0.8M NaHCO<sub>3</sub> 水溶液に 0-125 mM の範囲にて 25 mM 間隔で Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えてジャケット液を調製した。異なる Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 濃度のジャケット液を封入したチップを 7 日間インキュベーションして、1, 2, 3, 7 日後の培地リザーバの pH と液温を測定して、pCO<sub>2</sub> を算出して図 4-5 にまとめた。このグラフより、ジャケット液の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 濃度が増えるにつれて pCO<sub>2</sub> の最大値と時間変化による pCO<sub>2</sub> 変化が抑制され、安定した pCO<sub>2</sub> が得られた。特に、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 濃度が 75 mM 以上の条件で、1 日後と 7 日後の pCO<sub>2</sub> 変化が ±0.5% 以内となり、少なくとも 7 日間は、pCO<sub>2</sub> を一定値に維持できることが示された。

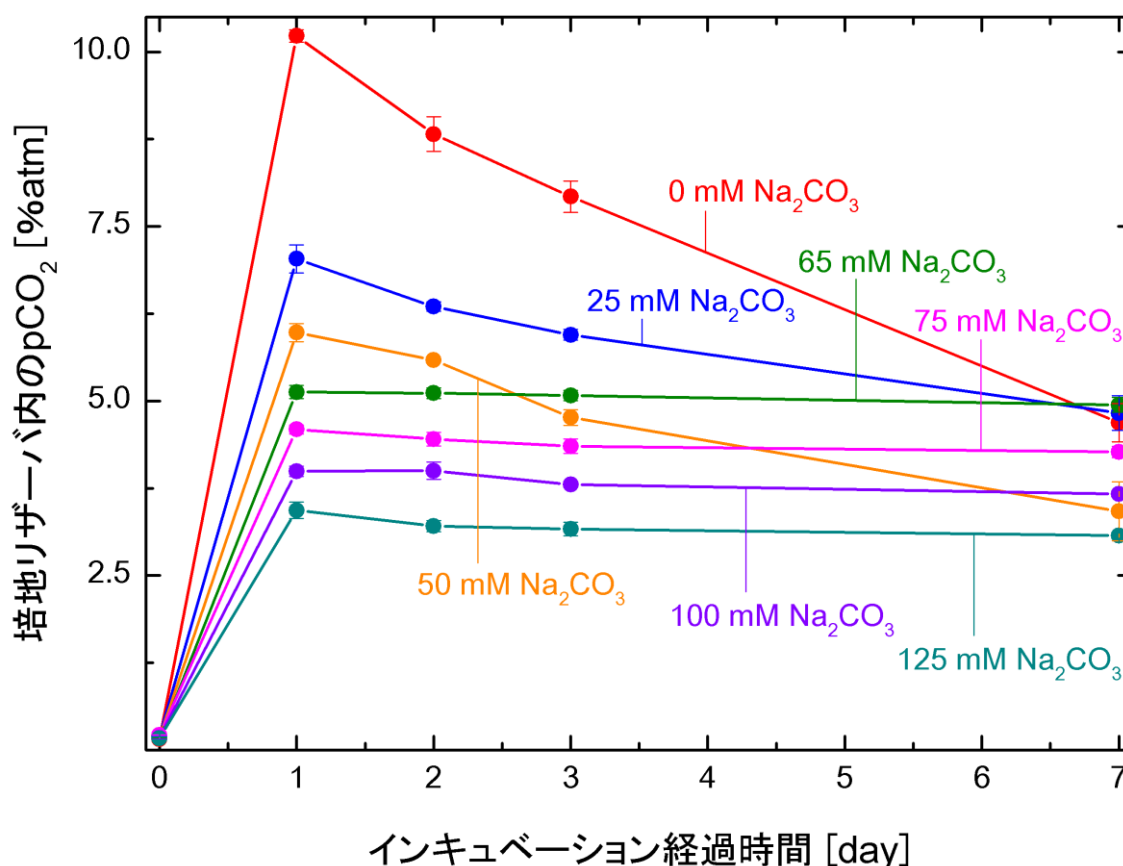


図 4-5. 炭酸ガス分圧の時間変化 縦軸に培地リザーバ内の炭酸ガス分圧(pCO<sub>2</sub>), 横軸にインキュベーションの経過時間をとった。異なる炭酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)濃度のジャケット液(0, 25, 50, 65, 75, 100, 125 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)の pCO<sub>2</sub> の時間変化をプロットした。プロットした pCO<sub>2</sub> の値は、平均値および標準偏差(n=3, ±SD)である。

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>濃度が75mM以上になると、pCO<sub>2</sub>の値の安定性が向上した。しかし、pCO<sub>2</sub>は約4.5%と5%には若干足りなかった。そこで75 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>の前後の濃度を調べた結果、65 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>で5% pCO<sub>2</sub>を1週間にわたり安定して維持することが確かめられた。これより、細胞培養に相当とされる5% pCO<sub>2</sub>をとるジャケット液の濃度組成は、0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 65 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>となることがわかった。

#### 4.4.4. NaHAsc を加えた場合の pCO<sub>2</sub>

NaHCO<sub>3</sub>とNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>と上記の濃度の組み合わせで溶かしたジャケット液に対して、NaHAscの有無がpCO<sub>2</sub>に与える影響を検証した。0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 75 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>のジャケット液にNaHAscを1.0 M 加えた場合と加えなかった場合(0M)での、1, 2, 3, 7日後の培地リザーバ側のpHと液温を測定して、pCO<sub>2</sub>を算出して図4-6にまとめた。

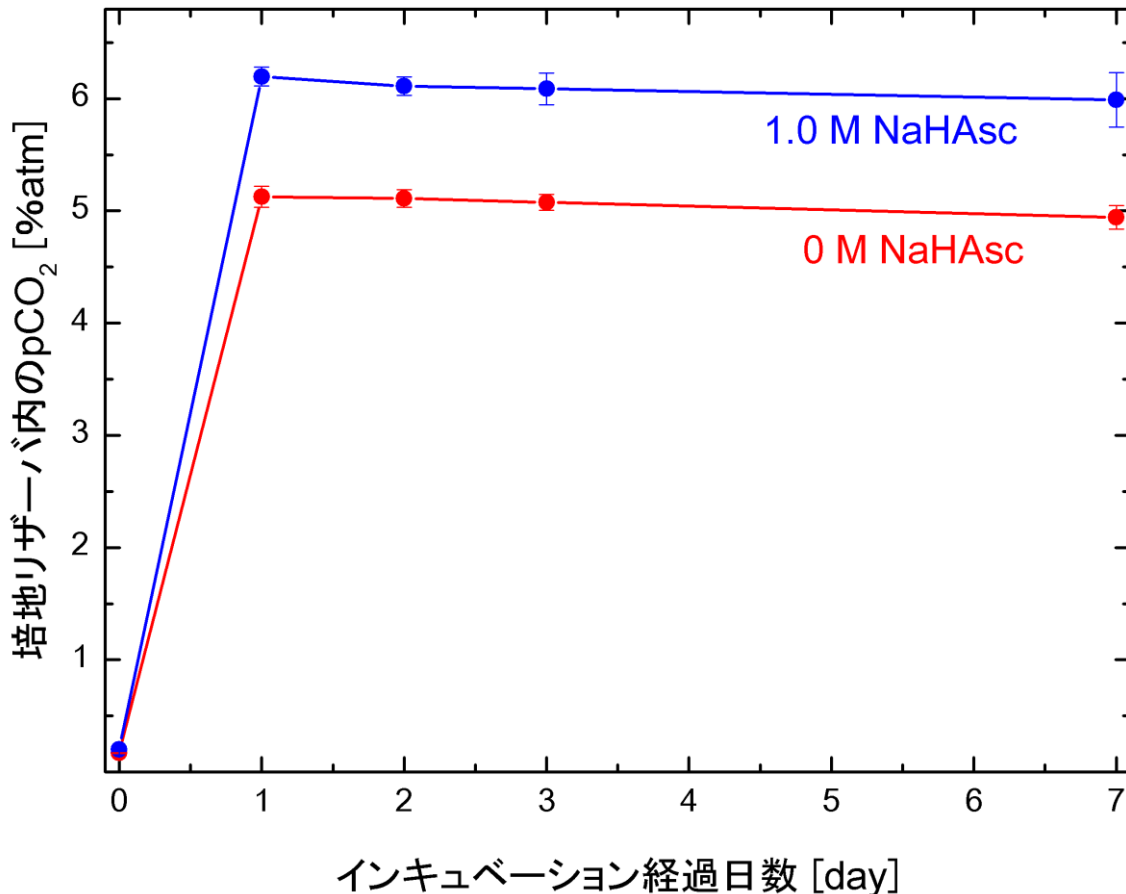


図4-6. アスコルビン酸ナトリウムを加えたジャケット液での炭酸ガス分圧の時間変化 縦軸に培地リザーバ内の炭酸ガス分圧(pCO<sub>2</sub>)、横軸にインキュベーションの経過時間をとった。0.8 M 炭酸水素ナトリウム(NaHCO<sub>3</sub>)と65 mM 炭酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)のジャケット液にアスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)1.0M を加えた場合と加えなかった場合(0 M)でのpCO<sub>2</sub>平均値および標準偏差(n=3, ±SD)をプロットした。

図 4-6 より, NaHAsc を加えたことで  $p\text{CO}_2$  が上昇することが確かめられた. これは, ジャケット液に NaHAsc を加えると, NaHAsc 由来の  $\text{H}^+$  が炭酸水素イオン( $\text{HCO}_3^-$ )に提供されることで炭酸( $\text{H}_2\text{CO}_3$ )および炭酸ガスの発生量が増加するためと考えられる. しかも, NaHAsc 濃度が上がれば  $\text{H}^+$  も増えるため,  $p\text{CO}_2$  上昇の度合は, ジャケット液に溶かす NaHAsc 濃度によって変化することも示唆された.

NaHAsc を加えたことによる  $p\text{CO}_2$  の上昇は, ジャケット液に溶かす  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度を増やすことで抑制できると考えた. これは, ジャケット液中の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  由来の炭酸イオン( $\text{CO}_3^{2-}$ )が増えることで NaHAsc 由来の  $\text{H}^+$  を捉え,  $\text{H}^+$  と  $\text{HCO}_3^-$  が反応して  $\text{H}_2\text{CO}_3$  をつくりにくくして炭酸ガス発生量を抑える平衡反応に基づく. これより, NaHAsc を加えたジャケット液で 5%  $p\text{CO}_2$  に調節するジャケット液組成を検証するため, NaHAsc を加えたジャケット液の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度を変えて  $p\text{CO}_2$  を調べた.

具体的な検討過程は, 三段階に分けられる. 第一に,  $p\text{O}_2$  が既知の 0.1, 0.5, 1.0 M NaHAsc(図 4-2 参照)を含むジャケット液について, ジャケット液の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度を 0 - 125 mM の範囲にて 25 mM 間隔で調製したジャケット液を封入したチップを 1 日インキュベーションした後の  $p\text{CO}_2$  を求めた. なお, ジャケット液の  $\text{NaHCO}_3$  濃度は, すべて 0.8 M である. 第二に, 得られた  $p\text{CO}_2$  から  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度との関係をグラフ化して近似曲線を取り, 5%  $p\text{CO}_2$  をとる  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度を推定した. そして最後に, 推定した  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度のジャケット液を実際に調製して, チップの  $p\text{CO}_2$  を測定して, 5%  $p\text{CO}_2$  となることを確かめた.

この検討をまとめたグラフを図 4-7 に示す. グラフは, 0.8 M  $\text{NaHCO}_3$  水溶液に異なる濃度(0, 0.1, 0.5, 1.0 M)の NaHAsc を溶かしたジャケット液について,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を 0 - 125 mM の範囲で 25 mM ずつ濃度を増やして溶解した場合における, 培地リザーバの  $p\text{CO}_2$  の変化をあらわす.

各ジャケット液は, いずれも加えた  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度が上昇するにつれ,  $p\text{CO}_2$  が単調減少した. これは, 先述したように,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  由来の  $\text{CO}_3^{2-}$  が NaHAsc 由来の  $\text{H}^+$  を奪い,  $\text{HCO}_3^-$  が炭酸になる反応を抑制したためと考えられる.

グラフ処理ソフト(Origin pro9.1, Lightstone, Tokyo, Japan)を用いて指数関数のカーブフィッティングから取得した推定曲線より, 5%  $p\text{CO}_2$  をとる  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度は, 0.1, 0.5, 1.0 M NaHAsc のジャケット液についてそれぞれ 75mM, 100mM, 110mM となった. そして, 得られた  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度で調製したジャケット液での  $p\text{CO}_2$  を実際に測定した結果, 0.1, 0.5, 1.0 M NaHAsc についてそれぞれ  $5.05 \pm 0.11\%$ ,  $5.02 \pm 0\%$ ,  $5.07 \pm 0.14\%$  ( $n=3$ ,  $\pm\text{SD}$ )といずれも 5%  $p\text{CO}_2$  といえるジャケット液の組成が得られた.

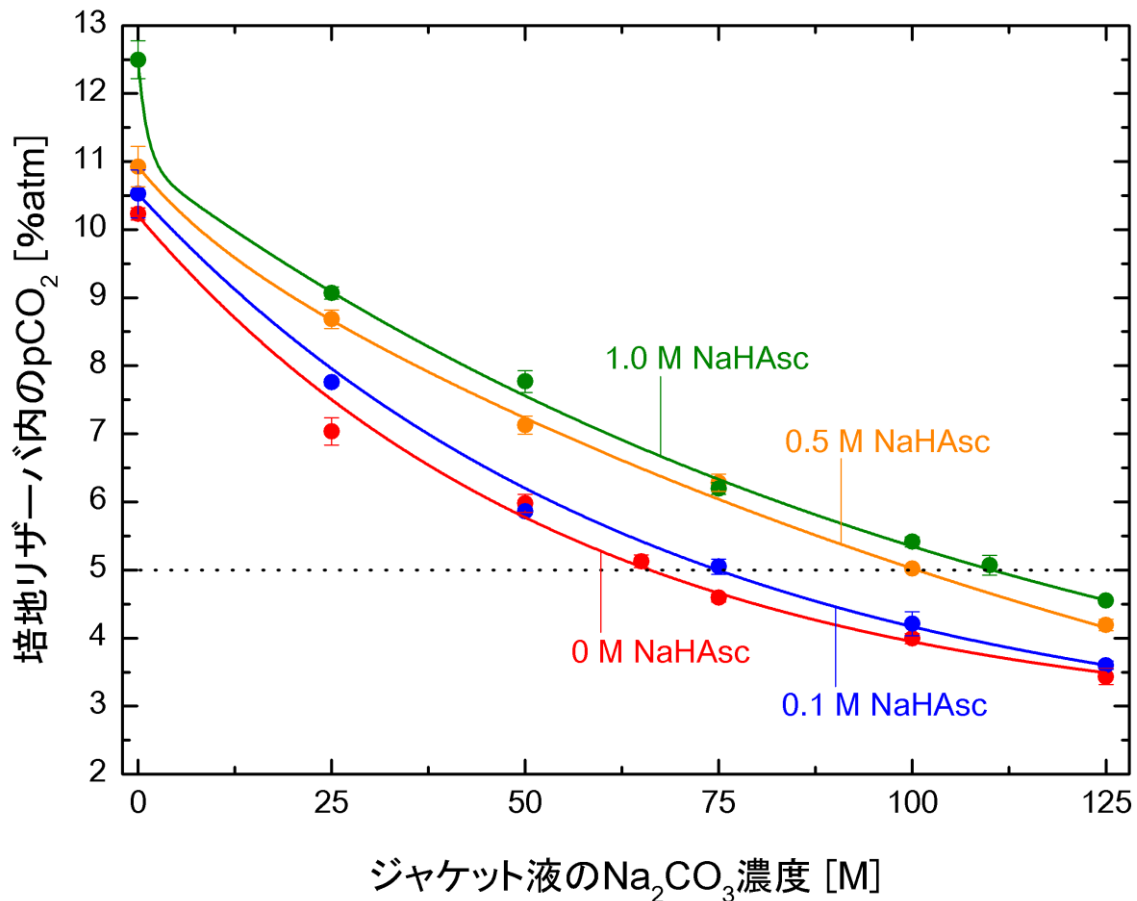


図 4-7. アスコルビン酸ナトリウムを加えたジャケット液での炭酸ガス分圧と炭酸ナトリウム濃度の関係 縦軸に培地リザーバ内の炭酸ガス分圧(pCO<sub>2</sub>), 横軸にジャケット液中の炭酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)濃度をとった. 0.8 M 炭酸水素ナトリウム(NaHCO<sub>3</sub>)に異なる濃度(0, 0.1, 0.5, 1.0 M)のアスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)を含むジャケット液に Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を加えた場合の pCO<sub>2</sub> を測定して, pCO<sub>2</sub> 平均値および標準偏差(n=3, ±SD)をプロットした. 破線は, 5% pCO<sub>2</sub> を示した.

まとめると, NaHAsc をジャケット液に加えたことによる pCO<sub>2</sub> の上昇は, ジャケット液の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 濃度を増やすことで抑制される. NaHAsc を含むジャケット液に異なる濃度の Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> を加えて pCO<sub>2</sub> 測定した結果, pO<sub>2</sub> が既知である 0.1, 0.5, 1.0 M を含むジャケット液が 5% pCO<sub>2</sub> をとるジャケット液の組成がわかった. ジャケット液の組成を [NaHCO<sub>3</sub>] - [Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>] - [NaHAsc] とあらわすと, 具体的な組成は, 0.8 M - 65 mM - 0 M, 0.8 M - 75 mM - 0.1 M, 0.8 M - 100 mM - 0.5 M, 0.8 M - 110 mM - 1.0 M となった.



図 4-7 の結果より, NaHAsc を含むジャケット液での  $p\text{CO}_2$  は, NaHAsc と  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  の濃度によって決定するといえる. そこで, 5%  $p\text{CO}_2$  における NaHAsc 濃度と  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度の関係を図 4-8 に示した. このグラフより, 任意の NaHAsc 濃度を含むジャケット液について, 5%  $p\text{CO}_2$  をとるために必要な  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度を読み取ることができる. これは, 必要とする酸素濃度を 5%  $p\text{CO}_2$  環境下で実現するジャケット液組成を算出するための重要な手がかりになる.

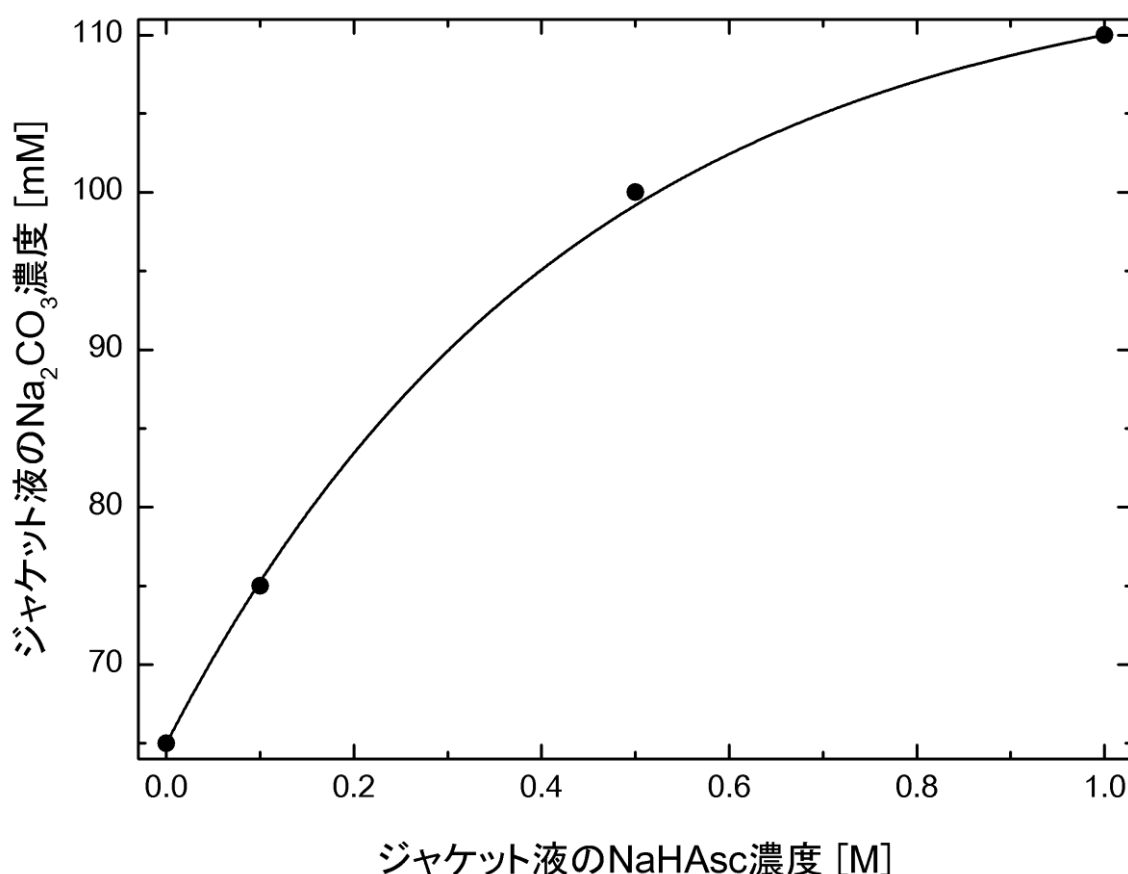


図 4-8. 5% 炭酸ガス分圧をつくるジャケット液中の炭酸ナトリウム濃度とアスコルビン酸ナトリウム濃度の関係 縦軸にジャケット液の炭酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )濃度, 横軸にジャケット液中のアスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)濃度をとった. 5%  $p\text{CO}_2$  となるときの  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度と NaHAsc 濃度(図 4-7 参照)をプロットして, 指数関数のカーブフィッティングした曲線をひいた. なお, ジャケット液の  $\text{NaHCO}_3$  濃度は, 0.8 M である.

図 4-8 の関係をジャケット液の NaHAsc 濃度と  $p\text{O}_2$  の関係(図 4-3 参照)と共に図示することで, 必要とする  $p\text{O}_2$  をとる NaHAsc 濃度における, 5%  $p\text{CO}_2$  となるための  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  濃度を読み取れば, ジャケット液の組成を決定することが可能となるだろう. 具体的には, 次項の結論にて述べる.

## 4.5. 第4章まとめ

本章では、製作したマイクロ流体チップの性能評価を目的として、チップの酸素分圧( $pO_2$ )および炭酸ガス分圧( $pCO_2$ )を実測した。その際、 $pO_2$ 測定は、測定セットアップを新規に設計、製作して確立した。

$pO_2$  および  $pCO_2$  測定の結果、炭酸水素ナトリウム( $NaHCO_3$ )、炭酸ナトリウム( $Na_2CO_3$ )、アスコルビン酸ナトリウム( $NaHAsc$ )を溶解して調製したジャケット液をマイクロ流体チップに封入してインキュベーションすれば、オンチップマルチガスインキュベーション効果により5%  $pCO_2$ を維持して、 $pO_2$ をおおよそ5-21%の範囲に調節できることが確かめられた。

5%  $pCO_2$ を維持しながら、必要とする  $pO_2$  で低酸素培養を可能とするジャケット液組成を見出すには、以下の図 4-9 からの読み取り法が实际的に容易な方法である。このグラフは、図 4-3 と図 4-8 を一つのグラフにまとめものである。

図 4-9 を利用してジャケット液組成の決定する方法は、具体的には以下のように行う。

- ① 5-21%の範囲で希望する  $pO_2$  を設定する：例として今回は、5%  $pO_2$  とする。
- ② 図 4-9 のうち  $pO_2$  と  $NaHAsc$  濃度の関係に注目して、希望する  $pO_2$ (左軸)をとる  $NaHAsc$  濃度(下軸)を曲線から読み取る。：5%  $pO_2$  では 1.0M  $NaHAsc$  となる。
- ③ 図 4-9 のうち 5%  $pCO_2$ をとる  $Na_2CO_3$  と  $NaHAsc$  濃度の関係に注目して、②で読み取った  $NaHAsc$  濃度(下軸)における  $Na_2CO_3$  濃度(右軸)を読み取る。：5%  $pO_2$  では 110mM となる。
- ④ 0.8M  $NaHCO_3$  水溶液に②で読み取った  $NaHAsc$  濃度と③で読み取った  $Na_2CO_3$  濃度で調製したジャケット液をチップに封入してインキュベーションする。：5%  $pCO_2$ を維持しながら 5%  $pO_2$  となるジャケット液は、1.0M  $NaHCO_3$  - 110 mM  $Na_2CO_3$  - 1.0 M  $NaHAsc$  となる。

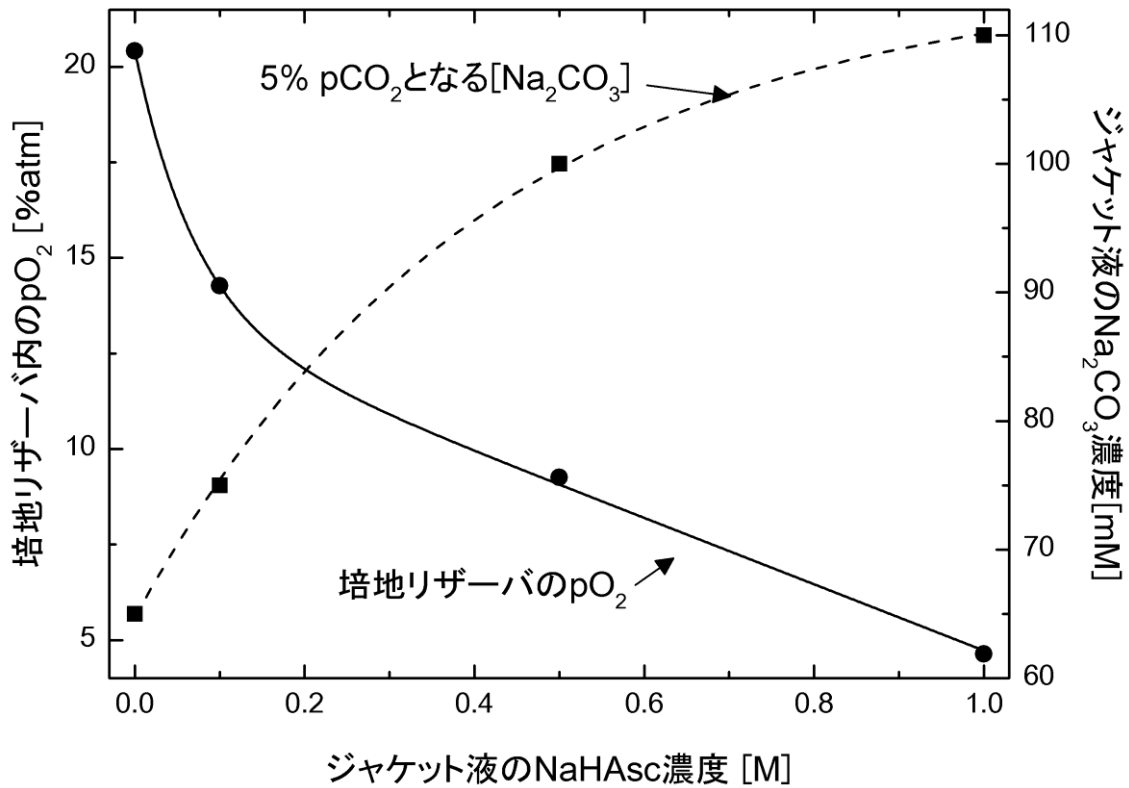
グラフから読み取らずとも、図 4-9 のフィッティングカーブの数式から、 $NaHAsc$  濃度と  $Na_2CO_3$  濃度は算出できる。任意の  $pO_2(x)$ をとる  $NaHAsc$  濃度(y)を数式(1)に示す。

$$y = 2.41 - 1.07(1 - e^{-x/3.23}) - 1.58(1 - e^{-x/10.08}) \quad (1)$$

次に、 $NaHAsc$  濃度(x)における 5%  $pCO_2$ をとる  $Na_2CO_3$  濃度(y)は数式(2)であらわす。

$$y = 65 + 25(1 - e^{-x/0.4}) + 24.89(1 - e^{-x/0.43}) \quad (2)$$

数式(1)、(2)を使えば、グラフを読み取らずにジャケット液組成を特定することができる。これより、5%  $pCO_2$ を維持しながら、任意の  $pO_2$  で低酸素培養するジャケット液組成を調べる方法が明らかになったといえる。



**図 4-9. ジャケット液の組成決定** 左軸に培地リザーバ内の酸素分圧(pO<sub>2</sub>), 右軸にジャケット液の炭酸ナトリウム(Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>)濃度, 横軸にジャケット液中のアスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)濃度をとった. NaHAsc 濃度に応じた pO<sub>2</sub> をあらわす曲線は, 左軸に対応する. 5% pCO<sub>2</sub> となる NaHAsc 濃度に応じた Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 濃度をあらわす破線は, 右軸に対応する. なお, ジャケット液の NaHCO<sub>3</sub> 濃度は, すべて 0.8 M である.

以上より, 製作した低酸素細胞培養システムが任意の低酸素培養雰囲気をつくる能力があり, 実際に細胞を低酸素培養する検証を行うに足る低酸素培養システムであることが確かめられた.

# 第5章 オンチップ低酸素細胞培養

## 5.1. 背景

本章では、設計して試作したオンチップ低酸素細胞培養システムを用いて実際に細胞培養を実施し、低酸素細胞培養システムとしての適否を評価する。この適正評価は、マイクロ流体チップの培地リザーバ内が大気酸素濃度に近い培養雰囲気と低酸素濃度とする培養雰囲気を設定して、双方の条件で培養した細胞を比較して行う。

培養条件は、大気条件、低酸素条件と定義した。大気条件は、アスコルビン酸ナトリウム(NaHAsc)を含まず炭酸水素ナトリウム( $\text{NaHCO}_3$ )と炭酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )で調製したジャケット液(0.8 M  $\text{NaHCO}_3$  - 65 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )をチップに封入して生成した培養雰囲気で、第4章の結果より、21%  $\text{pO}_2$ , 5%  $\text{pCO}_2$ となる。対して、低酸素条件は、NaHAsc と  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  で調製したジャケット液(0.8 M  $\text{NaHCO}_3$  - 110 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  - 1.0 M NaHAsc)で生成した培養雰囲気と定義して、第4章の結果より、5%  $\text{pO}_2$ , 5%  $\text{pCO}_2$ となる。

これら2つの培養条件で様々な細胞種を培養して、低酸素プローブと生死判定試薬で蛍光染色することで、培養システムで細胞培養または低酸素培養が実施できるか、低酸素培養した場合に現れるとされる特徴ある現象が本培養システム下でも再現するかを評価する。

低酸素プローブは、細胞膜透過性のイリジウム化合物が細胞内の酸素と結合して、赤色りん光を消光する特性を利用した細胞内の酸素イメージング試薬[31]である。

このプローブを使用した評価は、ラット由来肺胞II型上皮細胞(SV40T2細胞)を低酸素プローブで染色し、大気条件と低酸素条件を比較する。つまり、製作した培養システムで細胞が培養され、かつ低酸素条件において、培養雰囲気と同様に細胞も低酸素状態となるかに注目する。

一方で、生死判定試薬は、生細胞の染色試薬として Calcein AM[32]、死細胞の染色試薬として Ethidium Homodimer-1(EthD-1)[33]を使用する。Calcein AMは、細胞膜を透過して、細胞内でエステラーゼに加水分解されることで緑色蛍光を発する。EthD-1は、膜の破損した細胞(=死細胞)に入り核酸に結合して蛍光が増強されることで、赤色蛍光を発する。

これら試薬を使用した評価では、Rat adrenal pheochromocytoma cells(PC-12細胞)が低酸素において細胞死する現象[12]およびニワトリ胚 Dorsal root ganglia (DRG)の軸索伸長が低酸素において抑制される現象[34]を指標として確かめる。つまり、既に報告がある低酸素培養下に特徴的な現象が、培養システムにおいても同様に再現されるかに注目する。

以上のような評価実験を通して本章では、製作した低酸素細胞培養システムが細胞培養装置として適当かを判定する。

## 5.2. 目的

低酸素プローブと細胞の生死判定試薬による評価実験を行い，製作した低酸素細胞培養システムが低酸素細胞培養装置として適切か否かを検証する。

## 5.3. 実験方法

### 5.3.1. 低酸素プローブによる評価実験

#### 5.3.1a マイクロ流路の表面処理

本項は，低酸素細胞培養システムの構築(3.3.6 参照)まで終えた状態から述べる。

点字デバイスから取り外したマイクロ流体チップを UV 滅菌庫で 10 分間滅菌した後，クリーンベンチ内で培地リザーバのフタを開けて超純水を除き，DPBS(-)(D5773-10x1L, Sigma, MO, USA)に溶解した 50  $\mu\text{g/ml}$  Fibronectin(FN)(354008, Becton Dickinson, NJ, USA)120  $\mu\text{l}$  を入れた。フタをしめたチップは点字セルと点字デバイスを接続して，マイクロ流路内に FN を循環させて，流路を FN コート(25 $^{\circ}\text{C}$ ，2 時間)した。

FN コート後は，クリーンベンチ内で FN を除いて，10%(v/v) FBS(Moregate, QLD, Australia), 2mM L-alanyl-L-glutamine(GlutaMAX, 35050-061, Life Technologies, CA, USA)，抗生物質を含む DMEM(D5921, Sigma)120  $\mu\text{l}$  を入れて，点字デバイスで培地をマイクロ流路内に循環させた(25 $^{\circ}\text{C}$ ，1 時間)。

#### 5.3.1b 細胞懸濁液の調製

35 mm ディッシュに 80%程度のコンフルエントまで培養した SV40T2 細胞の培地を除き，Accutase(AT104, Innovative cell technologies, CA, USA)1.5ml を入れて 37 $^{\circ}\text{C}$ インキュベータ内に 3 分静置させたのち衝撃を与えて細胞を剥離して，遠心分離(100 $\times\text{g}$ ，3 分)した細胞に DMEM を加えて約  $10^6$  cells/ml の懸濁液を調製した。

#### 5.3.1c マイクロ流体チップへの細胞導入

クリーンベンチ内にデジタル倒立顕微鏡(EVOS XL, Life technologies)とノート PC，点字デバイスを持ちこんだ。チップの培地リザーバ内と導入口の培地を除き，導入口に懸濁液の液滴をつくるように約 2  $\mu\text{l}$  ほど盛り上げるように滴下し，ただちに点字デバイスで導入口からウェル方向に培地を流した。細胞が細胞培養ウェルに導入される様子を EVOS で観察して，ウェル内の細胞数が 50-100 cells となったところでマイクロ流路内の流れを停止した。細胞導入後は，細胞の沈降を待ち(1 分程度)，ウェルから導入口の方向に流れをつくって流路内の細胞を導入口にあつめた。導入口まわりの細胞を除いてから，さらに培地でピペティングして培地リザーバ内の細胞を除いて，あらためて新しい培地 1.5ml に入れ替えてキャップをしめた。

#### 5.3.1.d ジャケット液の封入とインキュベーションの開始

クリーンベンチ外に持ち出したチップのジャケットリザーバにジャケット液を封入した。大気条件(21% pO<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>)で培養するチップには, 1.0 M NaHAsc - 0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 65 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> のジャケット液で, 低酸素条件(5% pO<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>)で培養するチップには, 1.0 M NaHAsc - 0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 110 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> のジャケット液でジャケットリザーバを満たし, 注入口をポリイミドテープで封じた。チップは, サーモプレート(37°C)上に配置して点字デバイスに接続し, インキュベーションを開始した。

#### 5.3.1.e 低酸素プローブによる蛍光染色

インキュベーションを開始してから2日経過時に, 培地リザーバ内の培地を2 μM 低酸素プローブ(Lox-1, Scivax, Kanagawa, Japan)を含むDMEM培地1.5mlに入れ替えた。低酸素プローブを含む培地で1日インキュベーションして, インキュベーション開始3日後に共焦点レーザー走査型顕微鏡(Fv-10i, Olympus, Tokyo, Japan)で細胞培養ウェル内の細胞の蛍光像を撮影した。なお, 細胞の位相差像は, 共焦点顕微鏡を用いて3日間のインキュベーション期間中, 毎日撮影を行った。インキュベーションを開始して3時間程度して細胞の接着を確認した際にDay0を撮影して, Day0から1日間隔で位相差像を撮影した。

### 5.3.2. 細胞の生死判定試薬による評価実験

#### 5.3.2a マイクロ流路の表面処理

低酸素細胞培養システムの構築(3.3.6 参照)までを終えた状態から述べる。生死判定試薬による評価実験にて培養するPC-12細胞とDRG神経細胞のうち, PC-12細胞は, 5.3.1aで実施したFNコートと同様に行った。

一方, DRG細胞では, マイクロ流路をpoly-D-lysineで表面処理を行った。点字デバイスから取り外したマイクロ流体チップをUV滅菌庫で10分間滅菌した後, クリーンベンチ内で培地リザーバのフタを開けて超純水を除き, 100 μg/ml poly-D-lysine(P7886, Sigma)120 μlを入れた。フタをしめたチップは, 点字デバイスに接続してマイクロ流路内にpoly-D-lysine液を循環させて流路表面を処理(25°C, 6時間)した。

#### 5.3.2b 細胞懸濁液の調製

PC-12細胞の懸濁液は, 5.3.1bと同様の調製方法で行った。

対して, DRG神経細胞の懸濁液は, 解剖したニワトリ胚から採取したDRGを分散して調製した。孵卵器に孵置した(38°C, 7日間)ニワトリ受精卵から得られたトリ7日胚を解剖して, DRGを採取した。採取したDRGは, 終濃度0.625%に調製したTrypsin(15090, Life technologies)で分散処理を行い, DMEM/F12(11320, Life technologies)にITSとPenicillin / Streptomycinを加えた培地に懸濁して, 10<sup>6</sup> cells/ml DRG細胞懸濁液を調製した。

### 5.3.2c マイクロ流体チップへの細胞導入

調製した懸濁液を用いて、5.3.1.cと同様の手順でマイクロ流路内にある細胞培養ウェルにPC-12 または DRG 細胞を導入した。

### 5.3.2d ジャケット液の封入とインキュベーションの開始

5.3.1.dと同様の手順で、大気条件または低酸素条件でPC-12, DRG細胞のインキュベーションを開始した。

### 5.3.2e 生死判定試薬による蛍光染色

PC-12細胞の蛍光染色は、インキュベーション開始1日後に行った。チップの培地を除いてDPBS(-) 1.5mlに入れて、点字デバイスで流路内の培地をDPBSに入れ替えて細胞を洗浄した。続いて、LIVE/DEAD cell viability assay kit(L3224, Life Technologies)の染色液(2  $\mu$ M Calcein AM, 5  $\mu$ M EthD-1 diluted in DPBS(-))を200 $\mu$ l入れて、細胞の染色処理を行った。細胞像の撮影は、デジタル倒立蛍光顕微鏡(EVOS fl, Advanced Microscopy Group, WA, USA)を用いて行い、位相差像および蛍光像を撮影した。なお、Day0の位相差像は、インキュベーションを開始して3時間程度して細胞の接着を確認した後に撮影した。

一方、DRGの蛍光染色は、インキュベーション開始3日後に行った。染色操作は、PC-12細胞と同じ手順で行い、同様にデジタル倒立蛍光顕微鏡で位相差像および蛍光像を撮影した。なお、位相差像の撮影は、インキュベーションを開始して3時間程度して細胞の接着を確認した後にDay0を撮影して、その後、1日間隔でDay1, Day2の撮影を行った。

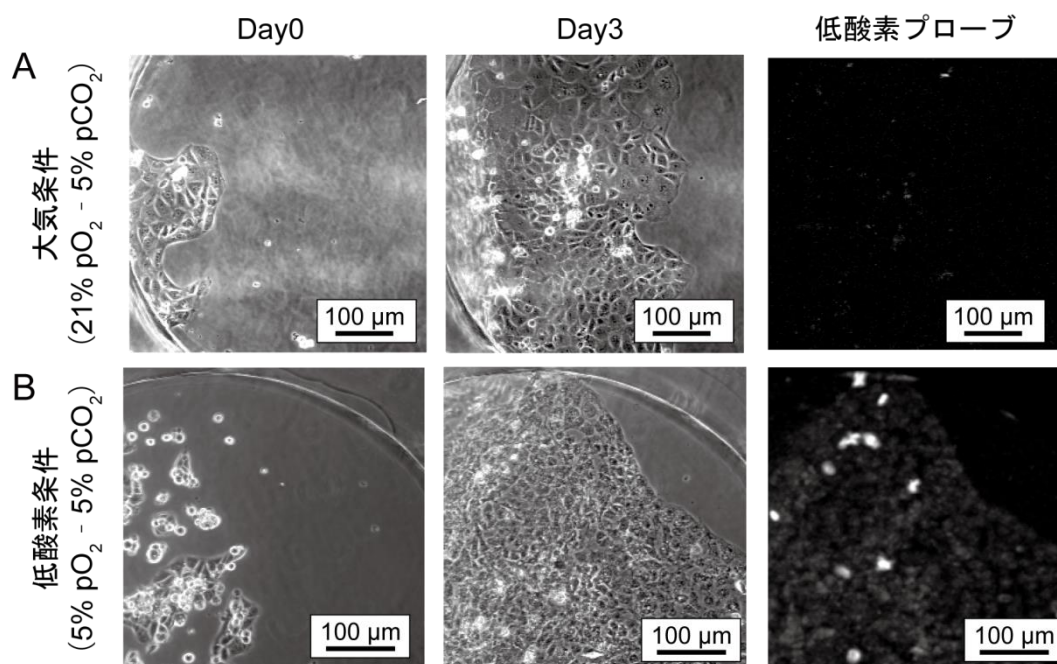
## 5.4. 結果と考察

### 5.4.1. 低酸素プローブによる評価

マイクロ流体チップに導入したSV40T2細胞を大気条件または低酸素条件で3日間培養して、低酸素プローブで蛍光染色した結果を図5-1に示した。

図5-1の位相差像をみると、マイクロ流体内に導入したSV40T2細胞は、大気条件、低酸素条件ともに生存して増殖した。低酸素プローブの蛍光像からは、低酸素条件でのみ蛍光が確認された。蛍光の特徴は、細胞の核以外の箇所が発光がみられ、細胞の状態や形状、周囲の細胞との重なりなど影響を受けてか、細胞ごとに蛍光の強さにムラがあった。

この結果より、製作したマイクロ流体チップでオンチップ細胞培養できることが確かめられた。また、ジャケット液を低酸素条件にした場合でのみ低酸素プローブによる蛍光が観察されたことから、培地リザーバ内の低酸素下でオンチップマルチガスインキュベーションされた培地が細胞に供給され、細胞を低酸素培養したことが示唆された。



**図 5-1. SV40T2 細胞のマイクロ流体下でのオンチップ低酸素培養** マイクロ流体下の細胞培養ウェルに導入した SV40T2 細胞を 3 日間培養した。A)大気条件(21% pO<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>)と B)低酸素条件(5% pO<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>)のジャケット液組成は、それぞれ 0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 65 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 110 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 1.0 M NaHAsc である(図 4-9 参照)。蛍光染色は、細胞内が低酸素状態であるほど蛍光強度が増大する低酸素プローブ(2μM)で行った。

## 5.4.2. 生死判定試薬による評価

### 5.4.2a PC-12 細胞の低酸素培養による細胞死の誘導

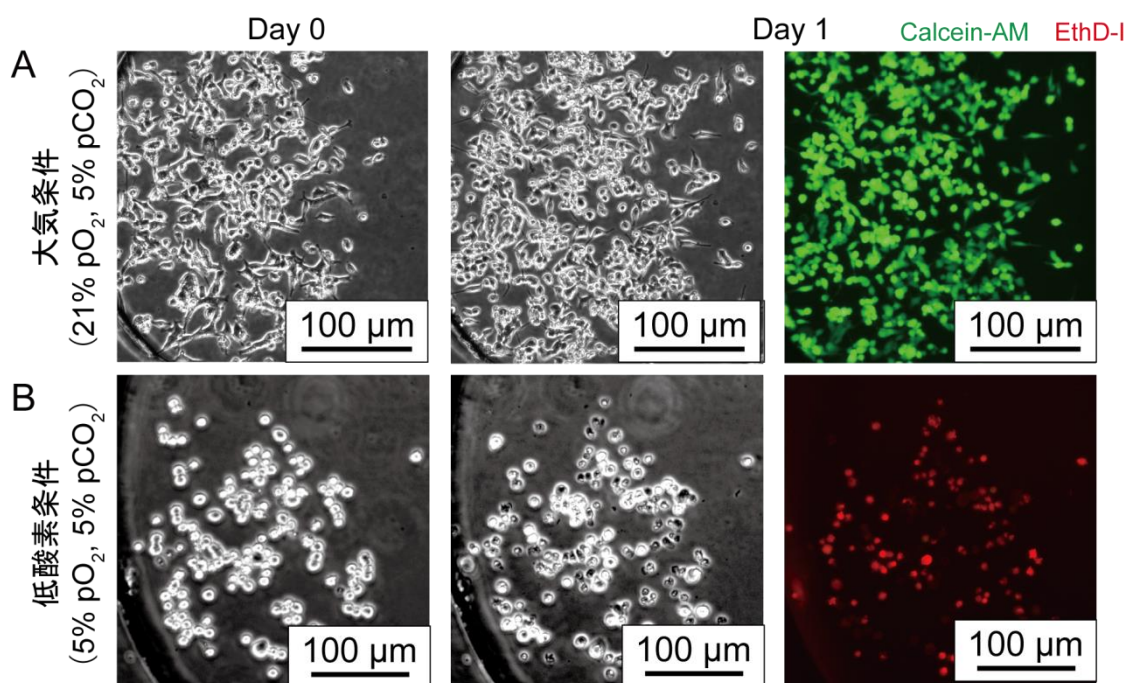
マイクロ流体下に導入した PC-12 細胞をオンチップ低酸素培養した結果を図 5-2 に示した。インキュベーション開始 24 時間後の PC-12 細胞は、大気条件(21% pO<sub>2</sub>)ではウェル底部に接着して壮健なのに対して、低酸素条件(5% pO<sub>2</sub>)では、細胞がはがれて浮遊しており、EthD-1 での蛍光染色による生死判定からも死滅が確認された。

この結果は、PC-12 細胞を低酸素に曝露するとアポトーシスやネクローシスが誘導されて細胞死するという報告[12]と似た現象である。ただし、報告では、マルチガスインキュベータで 2% pO<sub>2</sub> で培養した PC-12 の生存率は、24 時間経過時で 80%、72 時間経過時で 20% とあるので、培養システムで低酸素培養した細胞は、報告より急速に死滅した。



チップで死滅が早まった理由として、報告の実験で使用された従来型のセルカルチャーディッシュとチップとでは、表面体積比が異なることが考えられる。培地リザーバ内は、周囲をガス透過性の高いPDMS製隔壁に取り囲まれて、その隔壁を介して酸素吸収源(ジャケット液)と接触している。そのため、培地リザーバ内の酸素は、ディッシュに比べて拡散速度が早く、低酸素になりやすいことは想像に難くない。つまり、チップの培養空間の  $pO_2$  は 5%と報告(2%)より高いものの、チップ内でマルチガスインキュベーションした培地は、報告にあったマルチガスインキュベータでインキュベーションされた培地よりも低い酸素濃度となったことが示唆された。また、従来型のマルチガスインキュベータは、培地交換時に持ちこまれた溶存酸素の影響が否定できないこともあり得る。

これより、マイクロ流体チップで低酸素培養した場合でも、従来のディッシュと同様に PC-12 細胞は、細胞死が誘導されたのが確かめられたといえる。



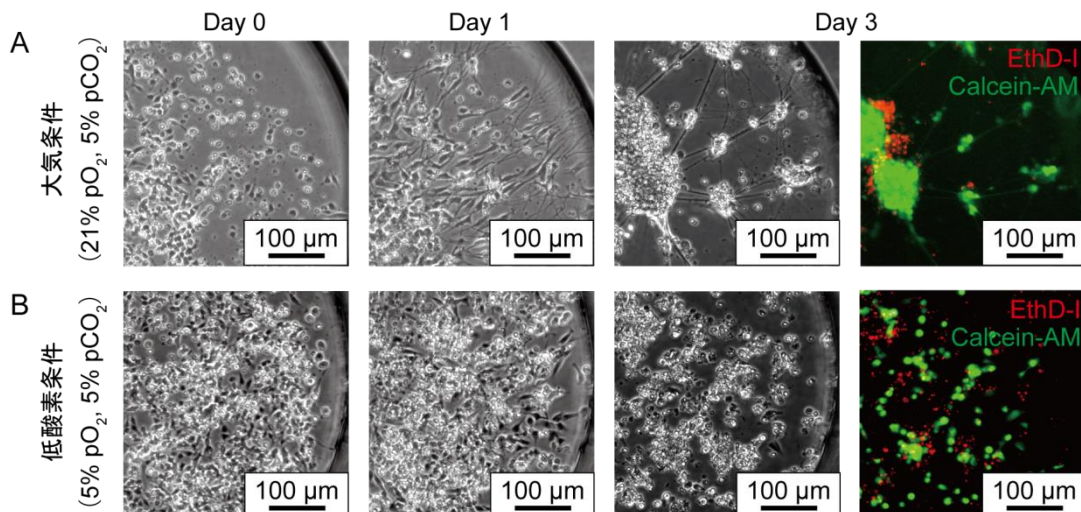
**図 5-2. PC-12 細胞のマイクロ流体下でのオンチップ細胞培養** PC-12 細胞をマイクロ流体下に導入して、オンチップ細胞培養を行った。培養雰囲気は、A)大気条件(21%  $pO_2$ , 5%  $pCO_2$ )と B)低酸素条件(5%  $pO_2$ , 5%  $pCO_2$ )であり、それぞれの条件でのジャケット液組成は、0.8 M  $NaHCO_3$  - 65 mM  $Na_2CO_3$ , 0.8 M  $NaHCO_3$  - 110 mM  $Na_2CO_3$  - 1.0 M  $NaHAsc$  である。蛍光染色は、2  $\mu M$  Calcein AM と 5  $\mu M$  EthD-1 で行い、生細胞は緑色蛍光、死細胞は赤色蛍光を示す。

#### 5.4.2a ニワトリ胚 DRG 細胞の低酸素培養による軸索伸長の抑制

図 5-3 にニワトリ胚 DRG 細胞を 3 日間オンチップ培養した結果を示した。

位相差像について、大気条件(21% pO<sub>2</sub>)、低酸素条件(5% pO<sub>2</sub>)ともに時間経過とともにグリア細胞が死滅し、神経細胞は凝集する傾向がみられた。細胞数の減少は両条件で起きたが、特に低酸素条件では、3 日後での全細胞の生存率は 50%程度となった。

軸索の伸長について、大気条件では、インキュベーション 1 日後から細く短い神経突起が無数にみられた。時間経過と共に突起の数は減ったが、太く長い軸索が現れた。他方、低酸素条件では、大気条件の軸索よりも細く短い突起がまばらにみられたが、3 日目にはそのほとんどが消失した。



**図 5-3. DRG 細胞のマイクロ流体下でのオンチップ細胞培養** DRG 細胞をマイクロ流体下に導入して、オンチップ細胞培養を行った。培養雰囲気は、A)大気条件(21% pO<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>)と B)低酸素条件(5% pO<sub>2</sub>, 5% pCO<sub>2</sub>)であり、それぞれの条件でのジャケット液組成は、0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 65 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0.8 M NaHCO<sub>3</sub> - 110 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> - 1.0 M NaHAsc である。蛍光染色は、2 μM Calcein AM と 5 μM EthD-1 で行い、生細胞は緑色蛍光、死細胞は赤色蛍光に染色した。

大気条件と低酸素条件を比較すると、細胞の生存率と軸索伸長の勢いに差が見受けられる。蛍光染色での生死判定より、3 日目のウェル内の細胞は、両条件とも多くが生存していることがわかる。それに関わらず、軸索伸長は、大気条件の方に勢いがあり、低酸素条件では伸長が抑制されているようにみえた。

神経細胞を低酸素培養すると生存率の低下と軸索の伸長が抑制される現象は、既に報告がある[34]。この報告によると、ディッシュ培養した神経細胞を 1%  $pO_2$  下で低酸素培養した場合で、軸索伸長が抑制され、低酸素培養 2 日目での生存率は 75%であったとされる。

この報告と今回のチップでの低酸素培養は、得られた結果に共通項が多い。その理由をチップでの低酸素培養が従来のディッシュでの低酸素培養と同様の結果をもたらしたと考えると理に適う。これより、低酸素下での DRG 細胞の細胞挙動は、製作した培養システムで再現できたといえる。

## 5.5. 第5章まとめ

本章では、低酸素プローブと生死判定試薬による評価実験を経て、製作した低酸素細胞培養システムが低酸素細胞培養装置として適当すると判断した。

SV40T2 細胞の低酸素培養からは、チップの細胞毒性の有無と低酸素条件で低酸素プローブの蛍光が取得できるかに注目した。結果、細胞は 3 日間生存したことから細胞毒性の問題は無く、図 5-1 より低酸素条件(5%  $pO_2$ )からのみプローブの蛍光が確認された。

PC-12 細胞の低酸素培養からは、従来のディッシュでの低酸素培養で明らかにされた低酸素培養した PC-12 細胞が細胞死する現象をチップ上で再現するかに注目した。結果、低酸素条件でのみ PC-12 細胞は死滅した。

DRG 細胞の低酸素培養からは、ディッシュでの低酸素培養で明らかになった、低酸素培養すると DRG 細胞の軸索伸長が抑制する現象がチップ上で再現するかに注目した。結果、低酸素条件でのみ DRG 細胞の軸索伸長が抑制された。

いずれの結果も、チップ上の細胞が低酸素培養されたことを支持するものである。以上より、製作した培養システムは、低酸素培養する雰囲気調節が可能であり、細胞培養システムとして使用できると結論付けた。

## 第 6 章 結論

マイクロ流体チップの製作方法と低酸素培養システムの運用方法を確立すべく第 3 章で行ったマイクロ流体チップの設計と製作は、設計どおりにチップを組み立てることができた。低酸素培養システムについても、マイクロ流体チップと点字デバイス、サーモプレートで構成されるセットアップ構築できた。今回製作したマイクロ流体チップは、以前製作した長期培養チップのデザインを踏襲した設計であるが、以前に設計したチップと比較して、材料費は半額以下になり、取り扱いやすさも向上して、より実用的なものとなった。

第 4 章のオンチップマルチガスインキュベーションの機能評価からは、マイクロ流体チップ上の酸素分圧 ( $pO_2$ ) および炭酸ガス分圧 ( $pCO_2$ ) の測定方法の確立と 5%  $pCO_2$  を維持した上で、必要な酸素分圧をとるためのジャケット液の組成を調べる方法も明らかになった。OCMI による酸素分圧の調節は、ジャケット液中のアスコルビン酸の穏和な酸素吸収により長期にわたり一定値をとることが確かめられた。さらに、炭酸ガス分圧では、ジャケット液中の炭酸水素ナトリウムと炭酸ナトリウムの重炭酸-炭酸緩衝系に加えて、アスコルビン酸の酸化によるプロトンの放出も安定性に寄与してすることがわかった。

細胞培養による低酸素培養システムとしての適否は、第 5 章で行ったオンチップ低酸素培養した細胞への低酸素プローブや細胞挙動による評価から、適正であると実証された。大気条件での培養は、生存と増殖したことから、培養システムに細胞毒性や汚染がないことが示され、低酸素条件では低酸素に対する細胞の応答挙動が示された。

マイクロ流体チップにジャケット液を封入するだけというシンプルな培養雰囲気調節方法にもかかわらず、チップ上の酸素分圧と炭酸ガス分圧を長時間安定して維持した低酸素培養が実施できるので、このチップを複数個用意すれば低コストで複数の酸素条件で同時培養する実験系が可能であり、空間的な負担が少ない。従来の培養方法に比べて、培養機器や周辺機器が必要なく、今後、このチップがより安価に大量生産できる改良が進めば、経済的な負担も減っていくだろう。

まとめると、本研究で製作した低酸素培養システムは、従来の低酸素培養方法で使用されてきた培養機器、配管や大がかりな送液装置を排して、シンプルで簡便な“スタンドアロン”といえる新規の低酸素培養システムを開発できたと結論づける。

## 第7章 今後の研究展開

最後に、オンチップマルチガスインキュベーション (OCMI) システムを利用した、今後の研究展開について述べる。

### ・オンチップ血管デバイス

ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVEC) は、培養すると組織化して血管構造をつくることが知られている。血管の新生や伸長は、ガンを代表とする疾患に深く関与することから重要な研究テーマとされている。マイクロ流体の分野では、例えば、マイクロ流路内で繊維芽細胞を含むゲル層を挟んで片側に HUVEC を配置して培養することで、HUVEC がゲル内部に侵入して血管づくり成長させるようなデバイス[35]があり、血管の新生や伸長などの生理や創薬などに研究に利用されている。これらの研究では、血管の成長や薬剤投与の直後、投与後の経過をつぶさに見守りたい要求があり、その要求に対して、開発した OCMI (あるいは OCI) が役に立つと考える。OCMI は小型で可搬性があるので、薬剤を投与した後顕微鏡ステージ上に配置して、細胞の様子をリアルタイムに観察しながらの培養が可能である。さらに、血管は、低酸素と深く関係するので、タイムラプス観察しながら低酸素培養が行える OCMI は有用な実験手段になるだろう。

### ・オンチップ水素富化細胞培養システム

オンチップマルチガスインキュベーションは、PDMS 製のガス透過隔壁を介したガス交換によって行うことから、酸素や炭酸ガスでなくとも気体であればガス交換の対象となる。そこで、近年、酸化ストレスに関連した疾患の治療薬として注目を集めている分子状水素の培養雰囲気調節した細胞培養システムが考えられる。分子状水素( $H_2$ )に生体内の酸素ラジカルを選択的に除去する作用があり、酸化ストレスに関連した疾患の治療薬として有用との報告[36]から、ジャケットリザーバ内に水素発生するような組成に調製したジャケット液をいれることでチップ上の分子状水素量を調節する細胞培養システムを開発することで、例えば、分子状水素が細胞に与える効果を調べる手段の提供や酸化ストレスに対して有効な分子状水素量の定量といった活用ができるだろう。

# 謝辞

本研究は、東京電機大学大学院 先端科学技術研究科 物質生命理工学専攻 博士後期課程 在学中に執り行われたものです。研究の遂行にあたり、多くの方々のご指導・ご協力をいただきました。

指導教員である本学 先端科学技術研究科 物質生命理工学専攻 田中真人教授には、本研究を推進するにあたり、常に大局的見地から本研究が目指すべきところをご指導いただきました。生化学者の立場からいただく助言は、細胞培養システムを実際に使用するエンドユーザーとしての声であり、培養システムの詳細な条件検討にとらわれがちな著者にとって、狭くなりがちな視界を広げる金言でした。なぜ本研究を実施するのか、本研究で開発した培養システムによってどのような影響を与えることができるのか、単なるものづくりに終始せず、その後の展開まで考えを張り巡らせる、研究全体を俯瞰した思考の実践を徹底的にご指導していただきました。加えて、培養システムを製作した後の細胞評価について、評価実験を滞りなく遂行する研究環境を整えていただき、実際に指導および助言をいただきました。その他にも、研究面以外の生活面では、著者の人生の岐路に多く立ち会っていただきました。大学入学前の進路相談の時には、初対面にもかかわらず親身に対応していただき、本学 生命工学科に入学する決断を助けていただきました。田中研究室に配属されて研究を開始するに際しては、本学 フロンティア共同研究センター(当時)での研究を薦めていただき、本研究につながる研究に出会うことができました。博士課程への進学の際は、長年の研究者人生に基づく経験談や人生哲学を伝えていただき、進学の決意を固める手助けをしていただきました。大学入学から9年間にわたり研究面はもちろん、生活面でも多くの訓示をいただきました。心より厚く御礼申し上げます。

芝浦工業大学 工学部 機械工学科 二井信行准教授(前 本学 フロンティア共同研究センター助教)には、工学を学んでこなかった著者に研究の立ち上げから研究活動の多くを一から懇切丁寧にご指導いただきました。より具体的には、微細加工から機械加工、デバイス設計などの実作業はもちろん、工学研究におけるものづくりが単に仕様を満たせば良いわけではなく、仕様を満たすための理論背景を構築し、実際に測定して検証した上で、論文としてとりまとめることを工学者の立場から徹底的にご指導いただきました。二井准教授のご助力がなければ本研究を行うことはできませんでした。加えて、日々の議論や進捗報告などを通して、意思伝達や課題解決の手段を示していただき、研究者だけでなく社会人としても必要不可欠なスキルをご指導いただきました。その他にも、海外を含めた数々の学会参加、科学セミナーの開催、研究所の運営補助、共同研究など、研究者が携わるであろう研究活動の多くを経験させていただき、研究面はもちろん、研究者としての立ち振る舞いなどの内面にも多大な影響を受けました。深く御礼申し上げます。

本学 先端科学技術研究科 物質生命理工学専攻 村勢則郎教授，川井悟教授，長原礼宗准教授には，博士学位審査の審査委員をしていただきました。深く御礼申し上げます。村勢教授には，博士後期課程初年度の指導教員も担当していただき，研究に遂行するための初期環境を整えていただきました。川井教授には，折に触れて想定外の鋭いご質問やご指摘をいただき，その度に自身を省みる機会をいただきました。長原准教授には，様々な機会では生化学者の立場からアドバイスをいただき，また，若手研究者としての在り方を勉強させて頂きました。先生方との議論から，普段の研究活動では見落としがちな，研究を客観視する重要性を真剣に考えるようになりました。ありがとうございました。

本学 先端科学技術研究科 物質生命理工学専攻長 篠崎開教授には，博士学位審査申請の際に，親切に対応していただき，貴重なアドバイスをいただきました。研究者として適切なポジティブさを持つことの意義を勉強させていただきました。御礼申し上げます。

本学 理工学部 電子・機械工学系 宮脇富士夫教授，本学 研究推進部 河野貴子様，皆川芳子様，本学 総合研究所 埼玉共同利用施設 奥泉みゆき様，尾上睦子様，戸谷恒夫様，布袋真理子様には，埼玉共同利用施設での研究活動に多大なご助力をいただきました。宮脇教授には，リサーチアシスタントの機会をいただき，河野様，皆川様，奥泉様，尾上様，戸谷様，布袋様，には，様々な事務手続き等で細やかな配慮をいただき，日々の研究を支えていただきました。心より御礼申し上げます。

本学 細胞分子生物学研究室および芝浦工業大学 細胞デバイス研究室の学生の皆様には，研究室セミナーなどで忌憚のない意見をいただきました。特に川島洋明先輩には，本研究に対しての率直な意見だけでなく，細胞の取り扱いなどで多くのアドバイスをいただきました。深く感謝申し上げます。また，同じ研究グループで研究活動に取り組んだ宮下三佳さん，小川智永君，猪又沙央理さん，滝澤和也君，松永仁来君，相澤典男君，遠藤己季代さん，柴田昌宏君，吉澤拓馬君，宮内健人君，茗ヶ原友洋君とは，学会参加や活発な意見交換などを通じて，一緒になってグループを盛りたててくれたことに感謝いたします。お世話になりました。

なお，本研究は，科研費(25350576)と特別研究員奨励費(24-11210)の支援を受けて行われました。ありがとうございました。

最後に，西尾佳明先輩，山口真輝先輩，岩谷健太郎君，近藤諒久君，田村翔君，為貝秀和君，星野秀明君，山本隆啓君，そして，博士後期課程への進学を見守ってくれた両親と応援してくれた祖父に心より感謝申し上げます。ありがとうございました。



## 参考文献

- [1]. Carreau, A., Hafny-Rahbi, B. E., Matejuk, A., Grillon, C., and Kieda, C. (2011) Why is the partial oxygen pressure of human tissues a crucial parameter? Small molecules and hypoxia. *J Cell Mol Med.* **15**, 1239-1253
- [2]. McKeown, S. R. (2014) Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *Br J Radiol.* **87**, 20130676
- [3]. Semenza, G. L., and Wang, G. L. (1992) A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 5447-5454
- [4]. Pugh, C.W, and Ratcliffe P.J (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med.* **9**, 677-684
- [5]. Sendoel, A., Hengartner, M. O., Apoptotic cell death under hypoxia. *Physiology.* **29**, 168-176
- [6]. Simon, M. C., and Keith, B. (2008) The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **9**, 285-296
- [7]. Lee, K., Roth, R. A., and LaPres, J. J. (2007) Hypoxia, drug therapy and toxicity. *Pharmacol. Ther.* **113**, 229-246
- [8]. De Bock, K., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2011) Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not?. *Nat Rev Clin Oncol.* **8**, 393-404
- [9]. Holleyman, C., Larson D Fau - Hunter, K., and Hunter, K. (2001) Simulation of ischemic reperfusion in endothelial cell culture increases. *J Extra Corpor Technol.* **33**, 175-180
- [10]. Guo, M., Song, L. P., Jiang, Y., Liu, W., Yu, Y., and Chen, G. Q. (2006) Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  independent mechanisms. *Apoptosis* **11**, 67-77
- [11]. Coimbra, I. B., Jimenez, S. A., Hawkins, D. F., Piera-Velazquez, S., and Stokes, D. G. (2004) Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **12**, 336-345
- [12]. Yoshimura, S., Banno, Y., Nakashima, S., Takenaka, K., Sakai, H., Nishimura, Y., and Sakai, N., Shimizu, S., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y., and Nozawa, Y. (1998) Ceramide Formation Leads to Caspase-3 Activation during Hypoxic PC12 Cell Death. *J. Biol. Chem.* **273**, 6921-6927
- [13]. Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., and Denko, N. C. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* **3**, 187-197



- [14].Allen, C. B., Schneider, B. K., and White, C. W. (2001) Limitations to oxygen diffusion and equilibration in in vitro cell exposure systems in hyperoxia and hypoxia. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **281**, L1021-L1027
- [15].Whitesides, G. M., (2006) The origins and the future of microfluidics. *Nature.* **442**, 368-373
- [16].Kim, L., Toh, Y., Voldman, J., and Yu, H. (2007) A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells. *Lab Chip.* **7**, 681-694
- [17].Yeon, J. H., Park, J., (2007) Microfluidic Cell Culture Systems for Cellular Analysis. *Biochip Journal.* **1**, 17-27
- [18].Brennan, M. D., Rexius-Hall, M. L., Elgass, L. J., and Eddington, D. T. (2014) Oxygen control with microfluidics. *Lab Chip.* **14**, 4305-4318
- [19].二井 信行, 高野 温, 宮下 三佳, 田中 真人 (2009) ポリジメチルシロキサン隔膜を介した水分・ガス交換による微小流体細胞培養デバイスのオンチップ CO<sub>2</sub> インキュベーション. *生体医工学.* **47**, 529-534
- [20].Takano, A., Tanaka, M., and Futai, N. (2012) On-chip CO<sub>2</sub> incubation for pocket-sized microfluidic cell culture. *Microfluid Nanofluidics.* **12**, 907-915
- [21].Futai, N., Gu, W., and Takayama, S. (2004) Rapid Prototyping of Microstructures with Bell-Shaped Cross-Sections and Its Application to Deformation-Based Microfluidic Valves. *Adv. Mater.* **16**, 1320-1323
- [22].Gu, W., Zhu, X. Y., Futai, N., Cho, B. S., and Takayama, S. (2004) Computerized microfluidic cell culture using elastomeric channels and Braille displays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 15861-15866
- [23].Futai, N., Gu, W., Song, J. W., and Takayama, S. (2006) Handheld recirculation system and customized media for microfluidic cell culture. *Lab Chip.* **6**, 149-154
- [24].Cruz, R. S., Camilloto, G. P., and dos Santos Pires, A. C. (2012) Oxygen Scavengers: An Approach on Food Preservation. Structure and Function of Food Engineering, *In Tech* (edited by Eissa, A. A.), 21-42.
- [25].Du, J., Cullen, J. J., and Buettner, G. R. (2012) Ascorbic acid: Chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* **1826**, 443-457
- [26].Njus, D., Jalukar, V., Zu, J., and Kelley, P. M. (1991) Concerted proton-electron transfer between ascorbic acid and cytochrome b561. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1179S-1183S
- [27].Buettner, G. R., (1988) In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals. *J. Biochem. Biophys. Methods* **16**, 27-40
- [28].Kautsky, H., (1939) Quenching of luminescence by oxygen. *Transactions of the Faraday Society.* **35**, 216-219

- [29].Severinghaus, J. W., and Bradley, A. F. (1958) Electrodes for Blood pO<sub>2</sub> and pCO<sub>2</sub> Determination. *J appl physiol* **13**, 515-520
- [30].Plummer, L., and Busenberg, E. (1982) The solubilities of calcite, aragonite and vaterite in CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O solutions between 0 and 90°C, and an evaluation of the aqueous model for the system CaCO<sub>3</sub>-CO<sub>2</sub>-H<sub>2</sub>O. *Geochim. Cosmochim. Acta* **46**, 1011-1040
- [31].Zhang, S., Hosaka, M., Yoshihara, T., Negishi, K., Iida, Y., Tobita, S., and Takeuchi, T. (2010) Phosphorescent light-emitting iridium complexes serve as a hypoxia-sensing probe for tumor imaging in living animals. *Cancer Res* **70**, 4490-4498
- [32].Weston, S. A., and Parish, C. R. (1992) Calcein: A novel marker for lymphocytes which enter lymph nodes. *Cytometry* **13**, 739-749
- [33].Gaugain, B., Barbet, J., Capelle, N., Roques, B. P., Le Pecq, J. B., and Le Bret, M. (1978) DNA bifunctional intercalators. 2. Fluorescence properties and DNA binding interaction of an ethidium homodimer and an acridine ethidium heterodimer. Appendix: Numerical solution of McGhee and von Hippel equations for competing ligands. *Biochemistry* **17**, 5078-5088
- [34].Honma, H., Gross, L., and Windebank, A. J. (2004) Hypoxia-induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons is associated with DNA damage recognition and cell cycle disruption in rats. *Neurosci. Lett.* **354**, 95-98
- [35].Kim, S., Lee, H., Chung, M., and Jeon, N. Li. (2013) Engineering of functional, perfusable 3D microvascular networks on a chip. *Lab Chip.* **13**, 1489-1500
- [36].Ohsawa, I., Ishikawa, M., Takahashi, K., Watanabe, M., Nishimaki, K., Yamagata, K., Katsura, K., Katayama, Y., Asoh, S., and Ohta, S. (2007) Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals. *Nat. Med.* **13**, 688-694