

学位論文内容の要旨

報告番号	先端科学技術 甲第一〇七号	氏名	高野 温
論文題目	On-chip multi-gas incubation for microfluidic cell cultures under hypoxia (和題: マイクロ流体チップ上での重炭酸・アスコルビン酸緩衝系による マルチガスインキュベーションを用いたオンチップ低酸素細胞培養システム)		

近年、血管新生や分化制御などの、生物学的にも医学的にも興味深い現象に細胞の低酸素応答が関わることを示す結果が数多く報告されている。従って、生体外での動物細胞の低酸素培養は、より生体内の低酸素環境を模した培養環境が求められるが、現状で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。代表的な低酸素培養装置であるマルチガスインキュベータは、炭酸ガスと窒素を外部から庫内に導入して低酸素雰囲気をつくりだし、細胞をまいた培養容器を庫内に静置して培養する。しかし、この方法は、装置を導入して運用する経済的なコストのみならず、培地体積に比べて大過剰な庫内の酸素濃度を制御するため空間的なコストに課題があり、複数の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になる。

そこで、本論文では、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低コストかつ省スペースで調べる方法として、マイクロ流体のもつ高い酸素雰囲気の制御性と低スペース、コスト性を有する酸素濃度の確度を両立すべく、マイクロ流路に導入する培地の二酸化炭素分圧と酸素分圧を同時に制御でき、かつそれに煩雑な機器を要しない低酸素細胞培養システムを開発した。本論文は全6章で構成される。

第1章 序論

本研究の背景として、動物細胞を低酸素培養する意義を述べ、現在行われている低酸素培養方法を示した。そして、これらの培養方法では、細胞周囲に無秩序に生成される酸素濃度勾配や経済的、空間的なコストが低酸素培養の導入障壁となることを課題にあげた。そこで、マイクロ流体のもつ高い酸素雰囲気への制御性と省スペース、低コスト性を活かし、マイクロ流体チップ上で二酸化炭素分圧と酸素分圧を制御して培養する（マルチガスインキュベーションする）細胞培養システムを提案し、その仕様を検討した。

第2章 目的

本論文が目指すところは、酸素制御性がよく、経済的・空間的なコストを解消した誰もが使いやすい低酸素細胞培養システムを開発して、低酸素培養の裾野を広げることである。よって、第1章で提案した低酸素細胞培養システムが低酸素培養に貢献する培養方法であるかを検証することが、本論文の目的となる。これより、① 低酸素培養システムの製作および運用方法の確立、② 培養システムで制御した雰囲気測定による性能評価、③ 低酸素培養を行い低酸素培養方法としての適性評価、を目的に設定した。

第3章 低酸素細胞培養システムの製作

マイクロ流体チップおよび低酸素細胞培養システムを製作する過程を示した。開発した低酸素細胞培養システムは、マイクロ流体チップと点字デバイスが5 cm×10 cm程のサーモプレートにおさまる小規模な培養系である。培養容器であるマイクロ流体チップは、26 mm×48 mmのガラスに接合したマイクロ流路の上に、培地およびジャケット液を封入する入れ子構造のリザーバを接着して製作した。点字デバイスは、マイクロ流路内の培地を循環するポンプとしてチップ装着する。サーモプレートは、チップ底面を細胞培養に適した37°Cに加温する用途に用いた。製作の結果、培養システムは、設計通りの実装を達成した。

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

マイクロ流体チップ上の炭酸ガス濃度および酸素濃度を測定して性能評価を行った。チップ上にある培養空間の雰囲気は、チップに封入したジャケット液の組成で変化する。そこで、ジャケット液中の炭酸供給源（重曹と炭酸ソーダ）と酸素吸収源（アスコルビン酸ナトリウム）の組成検討を行った。その結果、培養空間を、細胞培養に適切とされる炭酸ガス濃度5%に維持した上で、酸素濃度を5-21%の範囲で任意の値に制御するジャケット液の組成を調べる方法が明らかになった。加えて、ジャケット液での雰囲気制御は、少なくとも3日間はほぼ定値に維持することも確かめられた。

第5章 オンチップ低酸素細胞培養

開発した培養システムで低酸素培養が実施できるか、3種類の細胞をオンチップ培養して大気条件（酸素濃度20%）と低酸素条件（酸素濃度5%）のそれぞれの場合を比較した。ラット由来肺胞II型上皮細胞は、低酸素下で蛍光を発するプローブで染色を行い、低酸素条件の細胞でのみ蛍光が得られた。低酸素下で細胞死が誘導されるPC-12細胞の生存率評価は、大気条件では約9割の生存率に対し、低酸素条件では2割程度で細胞死がチップ上でも再現された。低酸素下で軸索伸長が抑制されるニワトリ胚後根神経節の神経細胞は、軸索伸長し細胞数で評価した。大気条件では約8割の神経細胞から軸索伸長したのに対し、低酸素条件では1割程度であったことから、軸索伸長抑制の傾向見られた。以上、これらの低酸素培養より、低酸素培養したディッシュ上で起きた現象がチップ上でも再現できた。

第6章 結論

本論文の結論を論じた。マイクロ流体チップ上でマルチガスインキュベーションする低酸素培養システムを確立し、性能評価より少なくとも3日間は、酸素濃度を5-21%の範囲に定値制御することを明らかにした。そして、この培養システムで低酸素培養した細胞の挙動より低酸素培養方法として適当と判断した。以上より、開発した低酸素細胞培養システムは、異なる酸素濃度の細胞挙動への影響を低コストかつ省スペースで調べる方法として、低酸素培養の裾野を広げる有用な培養方法であると結論付けた。