

学位論文審査の結果の要旨

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 (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)		
論文審査委員	主査 教授 田中 真人	副査 教授 村勢 則郎	教授 川井 悟
	准教授 長原 礼宗		

近年、半導体製作技術を利用した微小電子機械システム (MEMS; Micro Electro Mechanical Systems) の微細加工技術が大きく進歩し、様々な応用の可能性が検討されてきた。現在、多くの分析機器に実装されるに至っている。中でも、微小流路の中に極小な反応空間を設置したシステムを化学工業やバイオ技術に応用する分野では微小流体デバイス、微小流体チップと呼ばれ、microTAS (micro Total Analysis System) あるいは Lab on a Chip などと呼ばれる独自の研究分野を形成するに至っている。この技術を細胞培養の研究に利用して、一つの細胞に対して微細な環境を制御する試みが行われて注目を集めてきた。しかしながら、この技術には高度な加工技術と微小流体チップに接続する高度な制御装置および解析装置が必要であり、医学・生物学分野での広範な普及には至っていない。著者はこの技術を一般的な技術にするために、加工法の改良を行うと同時に、持ち運び可能な培養装置、特に培地の pH と酸素濃度を同時に制御できる自律型培養システムの開発を目的として研究を行った。

微小流体チップを作製する微細加工技術は半導体作製技術の応用であるため、専門的で大規模な工作機械が必要とされるが、著者はソフトリソグラフィ法によって基板上に作った流路鋳型でポリジメチルシロキサン (PDMS) を硬化させる方法を採用して微小流路の製造過程でのコスト軽減と将来の利用者の利便性を図った。しかしながら、PDMS にはガス交換能があって大気中のガス環境の影響が内部に及ぶため、外部の大きかりな制御装置の接続を前提としない自律システムの設計には大きな困難があった。著者はこの困難を逆手にとって、PDMS 素材を介するガス交換を積極的に応用するシステムの設計と最適化研究を行った。即ち、チップ上の微小流路システムを覆うようなジャケット構造を設置し、大気環境からの遮断を行うと同時に、ジャケット容器に炭酸ガスを発生させる炭酸水素ナトリウム溶液を封入して微小流路内の pH 変化を一定に保つ入れ子二重構造の微小流体チップを考案した。このジャケット容器内の溶液の組成および濃度を詳細に検討し、持ち運び可能な細胞培養用の微小流体システムを完成させた。この装置は、環境測定のための細胞センサーとして利用することが検討されている。

著者が設計し、最適化研究を行ってきたプロトタイプのこの自律型培養システムは流路を覆う PDMS 膜を介してガス交換が可能なことを示している。細胞培養の医学応用の分野

では酸素濃度が細胞に与える効果が極めて重要であることが最近になって判明し、細胞培養の分野では炭酸ガス培養装置からマルチガスインキュベータへの切替えが起こっている。ヒトを含む動物細胞培養の分野では pH の制御に加えて、酸素濃度の厳密な制御が求められるようになってきているのだ。著者は自ら開発した装置が、基本構造を変えずにマルチガスインキュベータに変換できることに気づき、直ちに PDMS 膜を介した酸素濃度制御の研究を行った。ジャケット容器内の炭酸水素ナトリウム溶液に高濃度のアスコルビン酸ナトリウムを加えることで分子状の酸素を消費し結果的に流路内の培地の溶存酸素を減少させるという戦略を採用することで、自ら設計した微小流体チップを低酸素培養用のマルチガスインキュベータとして機能させることに成功した。ジャケット液の詳細な条件検討の結果、炭酸ガス濃度に加えて、酸素濃度を分圧換算で 5% から 21% の範囲内で制御可能となった。

著者はこの装置を用いて、ラット肺胞 II 型上皮細胞、ラット副腎髄質由来褐色細胞腫、ニワトリ胚後根神経節の感覚神経細胞などを用いて低酸素下での培養を行い、それぞれの細胞種が示す低酸素応答、即ち低酸素応答遺伝子の発現、細胞死、軸索伸長などの現象を微小流体チップ上で再現することに成功した。本培養システムが細胞を低酸素培養する方法として適当であると確かめることができた。著者は、今後ガン研究や初期胚の研究にとって極めて重要となる低酸素培養法にとって、本培養システムが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ための優れた解決法となると結論付けた

本自律型微小流路培養法は、単に低コスト低酸素培養装置の提案に留まらない。この装置は基本的にスライドガラス上で構築するように設計されているため、このまま各種の顕微鏡に設置し、各種の細胞を生きたままの長期観察や動画撮影が可能となることを意味している。この開発が一つの発明に終わらずに、新たな研究領域を作り出したと言える。

以上、本論文において著者が検討して得た結論に記された事柄は極めて有用であると判断でき、かつ本論文の価値は工学的なもの作りの観点からも製品化の検討に耐えうると評価できる。よって、本論文は博士（工学）の学位論文として十分な価値を有するものと認められる。