

## 二系統灌流培養可能な密閉型三次元培養システムの開発

## Development of the closed three-dimensional culture system with two lines perfusion culture

○ 外處侑(電機大) 松永章弘(NCGM) 志村まり(NCGM) 向林宏(IWAKI) 片野一夫(電機大)

野口展士(電機大) 荒船龍彦(電機大) 福井康裕(電機大) 本間章彦(電機大)

Susumu TODOKORO, Tokyo Denki University

Akihiro MATSUNAGA, National Center for Global Health and Medicine

Mari SHIMURA, National Center for Global Health and Medicine

Hiroshi MUKAIBAYASHI, IWAKI CO., LTD.

Kazuo KATANO, Tokyo Denki University

Hiroo NOGUCHI, Tokyo Denki University

Tatsuhiko ARAFUNE, Tokyo Denki University

Yasuhiro FUKUI, Tokyo Denki University

Akihiko HOMMA, Tokyo Denki University

**Abstract:** The three-dimensional cell culture is the powerful tool for evaluate behavior of virus and medicine in vitro compared with two-dimensional dishes. We established technique to construct a capillary network in the cultured cell group using three-dimensional fibrous scaffold and perfusion culture. In study we developed two lines perfusion culture systems with three-dimensional scaffold in which one line was for culture cell and another one was for delivering virus or medicine. This system was closed circuit and composed by silicone tube, roller pump, reservoir and three-dimensional scaffold. All devices except pump were set on CO<sub>2</sub> incubator. From the aspect of appropriate culture condition, we evaluate pH and temperature change in 48 hours run. As a result, two system perfusion culture systems were able to stabilize temperature and pH in 24 hours run.

**Key Words:** three-dimensional culture, closed, perfusion culture, two lines

## 1. 背景

HIV-1 を始めとするウィルスのような生体作用や、生体へ感染後に疾患へ発展するメカニズムが未だ不明な重篤なウィルスの作用機序解明には、培養細胞を用いた基礎的検討が欠かせない。細胞培養には、培養皿を用いた二次元培養と、立体的に構築された足場材を用いた三次元培養の二種類の手法がある。二次元培養は *in vitro* での細胞、薬剤等の相互作用の観察や研究を簡便に行う事が可能だが、*in vivo* での細胞増殖とは形態が異なるとされている。実際の生体内においては、細胞は三次元的に増殖して組織や臓器を形成しているため、より生体内に近い三次元細胞培養環境を実現することが重要である<sup>(1)</sup>。

我々は既報にて繊維製スキャフォールドと灌流培養を組み合わせ毛細血管を構築し、より生体内環境に近い培養手法を確立した。

## 2. 目的

そこで、本研究では、培養中の細胞の観察が可能で、三次元培養環境を維持しながら、ウィルスや薬品の添加が可能な二系統流路を有する、密閉型灌流培養システムを開発することを目的とした。

## 3. 要求仕様

開発する二系統密閉型灌流培養装置の達成すべき要求仕様を以下に示す。

- (1) コンタミネーションの防止
- (2) 三次元培養可能
- (3) 培養細胞の形態を観察可能

(4) 培養後の細胞群へ試薬等を添加可能

(5) 細胞培養中の培養液を回収可能

## 4. 二系統密閉型灌流培養システム

二系統灌流培養システムは、各要求仕様を満たすため、三つの構成要素から成る。各構成要素は、1、密閉型灌流回路(要求仕様1)、2、三次元スキャフォールド(要求仕様2,3)、3、二系統灌流回路(要求仕様4,5)である。

構成要素1、密閉型灌流回路は、コンタミネーションを防ぐため、回路全体が密閉されている。細胞培養では、温度、酸素、二酸化炭素の管理が重要である。本システムは、ガス透過性の高いシリコンチューブ(外径6mm、内径4mm、長さ3m)を使用し、回路をCO<sub>2</sub>インキュベーター内に設置、ローラーポンプによって培養液を灌流させることで培養液中のガス濃度を調整可能である。

構成要素2、三次元スキャフォールドは、エレクトロスピニング法によって作製可能な、マイクロファイバーと人工血管を組み合わせた構造である。細胞をマイクロファイバー上に播種し、人工血管中に培養液を灌流させることで、細胞を三次元的に培養することが可能である。

構成要素3、二系統灌流回路は、回路全体の密閉性、培養細胞が観察可能な環境を維持するため、流路を二系統にし、ローラーポンプの位置を切り替えることで、培養細胞に対して試薬等を添加することが可能なシステムである。Fig.1に、二系統密閉型灌流培養システムの全体図を示す。

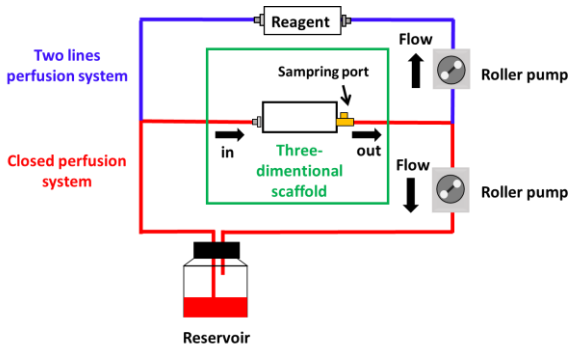


Fig1. Perfusion system

5. 密閉型灌流回路の性能評価実験

開発した構成要素 1, 密閉型灌流回路の性能評価実験を行った。まず、システム単体の評価をするため、細胞培養は行わずに、培養液中の温度、pH を細胞培養に適した環境に安定させることが可能か、Table 1 に示す実験条件のもと、計測を行った。Fig.2 に構築した評価実験システムの概略図を示す。

Table 1 experimental conditions

Medium	D-MEM(High glucose)+10%FBS
Volume	480 [mL]
Flow rate	15 [mL/min]
Gas condition	5%CO <sub>2</sub> in air
Temperature	37 °C
Sampling time	0,2,4,6,8,10,12,24,48 [hour]

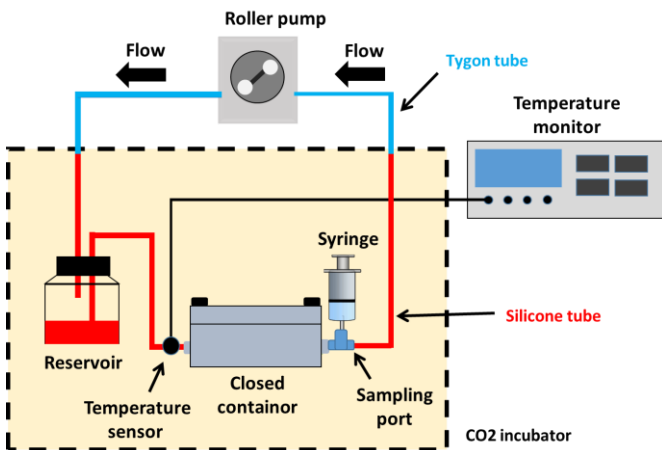


Fig.2 Closed perfusion culture system

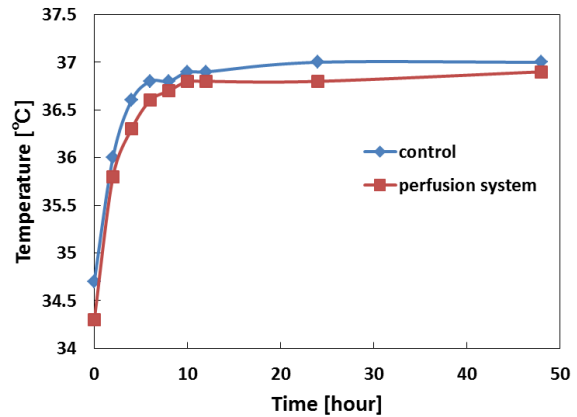
CO<sub>2</sub> インキュベーター外でのシリコンチューブによるガス交換を防ぐため、CO<sub>2</sub> インキュベーター外はガス透過性の低いタイゴンチューブ(外径 6mm、内径 4mm、長さ 0.5m)を使用した。コントロールとして、細胞培養で一般的に用いられている細胞培養用フラスコ 600 (住友ベークライト(株)) を使用した。

評価実験での測定項目は、細胞培養でコントロールすべき項目である培養液中の温度、pH とした。温度測定には、ルアーロック式温度センサー (泉工医科工業 (株)) を使用し、センサーをチューブの中に挿入し、センサーが培養液に接触するように設置した。センサーは温度計測機(Digitec

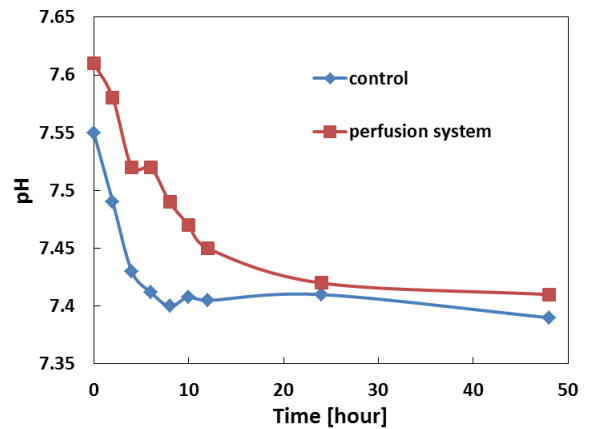
Corporation Lancaster,PA) に接続し、real time に培養液温度を測定可能な構成になっている。pH、の測定は、サンプリングポートよりシリンジで培養液を採取し、ガス分析装置 Rapid Lab348 (Siemens AG) にシリンジを接続することで測定した。

6. 実験結果及び考察

以下に、培養液温度、pH の時間変化を示す。



(a) Temperature



(b) pH

Fig.3 results

Fig.3 より、本研究で開発した密閉型灌流回路は、培養液温度は実験開始から 6 時間後に 37 度付近にまで上昇した。pH は、24 時間後に 7.4 付近にまで下降し、48 時間後でも 7.4 付近を維持することが可能であった。

以上の結果から、本研究で開発した密閉型灌流回路は、密閉環境を維持しながら細胞培養に適した環境を維持することが可能であることが明らかとなった。また、密閉型灌流回路を使用することで、密閉環境を維持しながら細胞培養を行うことが可能であることが示唆された。

参考文献

- (1) 上岡なぎさ 他, ヒト三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確立と表皮分化へのCキナーゼの関与, 昭和医学会雑誌, 2011
- (2) 外處侑 他, 画像解析による等時相線図を用いた培養毛細血管網構築の可視化に関する研究, LIFE2014, 2014