

微小重力環境における高密度動物細胞培養液の分離精製実験 (ANTIBODY)

代表研究者： 奥沢 務^{*1}
 共同研究者： 坪内邦良^{*1}、浜野亘男^{*2}、馬場研二^{*3}、
 芳賀良一^{*3}、石川孝一^{*2}

^{*1} 日立製作所 機械研究所(現在 電力・電機開発本部)、
^{*2} 日立製作所 宇宙技術推進本部、^{*3} 日立製作所 日立研究所

Our sample was cell culturing liquid containing of cells, cell-produced antibody and culture medium. Space electrophoresis is expected to promote separation resolution remarkably due to absence of gravity. In order to evaluate microgravity effect on electrophoretic separation, we took part in the IML-2. In spite of several malfunctions, our experiment was carried out and revealed as follows. Cells cultured in space produced double the amount of antibody secreted by those on earth. In addition, space electrophoresis, as far as electrophoresis could occur despite bubble existence, was found to give much stabler performance than that on earth.

実験の目的、意義

本実験テーマの泳動試料の構成成分を表1に示す。試料は細胞と培地の懸濁液で、細胞(図1)はSTK1と呼ばれる。この細胞株は、免疫の反応である抗原-抗体反応に欠かすことができないモノクローナル抗体の1種である免疫グロブリンG(IgG)を産生する。現在このIgGは、癌の治療薬及び診断薬として最も期待が持たれている。この細胞の場合、通常の培養フラスコで培養すると細胞濃度が約 2×10^6 個/cm³で飽和する。このときのIgGの産生濃度は5~20 µg/cm³程度となる。この生産性を向上させるため新方式のバイオリアクタが開発¹⁾され、細胞濃度で 4×10^7 個/cm³、IgG濃度で100~500 µg/cm³が達成されている。しかし、現状の分離精製プロセスは、数段からなる濾過過程、液体クロマトグラフィでの最終的精製過程及び濃縮過程よりなっており非常に複雑である。このため、

表1 泳動試料の構成成分

細胞	細胞(STK1) ↓合成・分泌
	免疫グロブリン(IgG) ↑ 癌の診断薬及び治療薬として期待
培地	ダルベッコ変成イーグル培地
	ヘベス
	カナマイシン
	新生子牛血清
	炭酸水素ナトリウム
	ブドウ糖

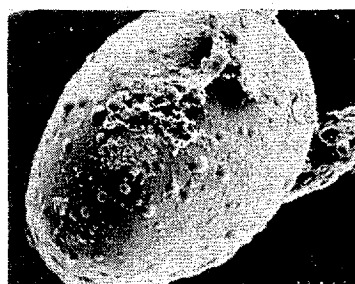


図1 細胞(STK1)

分離能および分離量にも限界があるので、高密度細胞培養プロセスの発達とともに分離精製プロセスが全製薬プロセスの問題点となりつつある。この解決策の一つとして期待されているのが、微小重力環境における連続無担体電気泳動法の適用である。この方法の原理的実現性を検証することがIML-2に応募した目的である。

実験の方法と試料

実験概要^{2~8)}

実験概要を図2に示す。すなわち、細胞培養キット(CCK)の細胞培養容器を使用して恒温恒湿槽(TEI)に入れ、6日間軌道上で細胞を培養

し、その後細胞培養懸濁液を宇宙用電気泳動槽(FFEU/FM)に直接注入し分離する。泳動分離された試料は、 -20°C の冷凍庫に8日間保存される。着陸後、速やかに地上の冷凍庫に移され、その後実験研究者のところに輸送される。この分取試料を分析することによって有用物質(IgG)の純度、収率に関するデータを把握することができる。

電気泳動槽内部は薄い矩形断面の流路となっており、上部から導電性を有する緩衝液を導入して安定した液膜流れを形成する。この流れに試料液を連続的に注入し緩衝液とともに流下させる間に流れと直交する方向に電界を加えると、電気泳動現象によって試料液中の帯電性粒子は電界方向へ荷電量に応じた力を受けて移動する。実際には、試料液中の帯電性粒子が緩衝液の流れに運ばれて流下する速度と電界方向への泳動移動速度との合成ベクトル方向に偏向するため、図2のように泳動槽内では同一の泳動移動度の粒子群は带状となって流下する。泳動槽下端には60チャンネルの分取部が設けられておりこの分取チャンネルに試料中の各成分毎に分離したものを得ることができる。

泳動槽内の電界は、槽の両側端にある電極間に直流電圧を加えて作るため緩衝液中にイオン電流が流れジュール熱が発生する。このジュール熱によって槽内に液温分布が形成されると、熱対流が発生して層流状の液膜流れが乱れ定常的な泳動分離が困難となる。このため、地上用の無担体連続電気泳動装置では、この熱対流を防止するために槽内流路厚さを1 mm以下に抑える必要

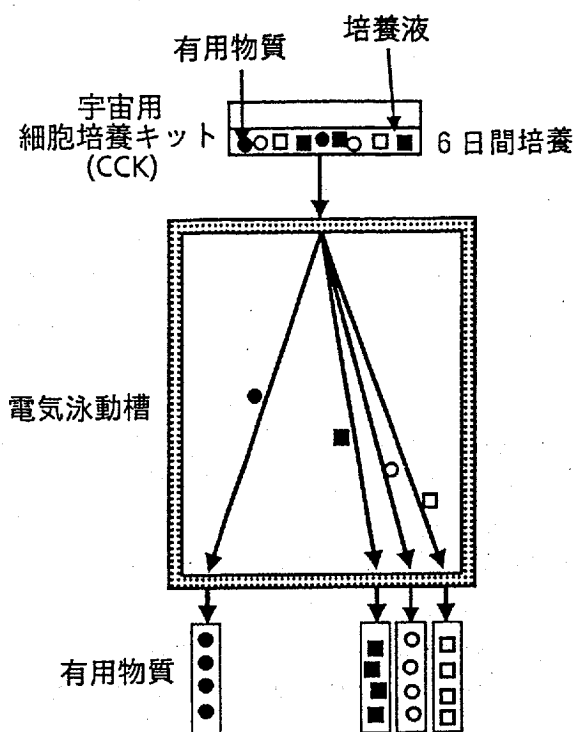


図2 軌道上実験の概要

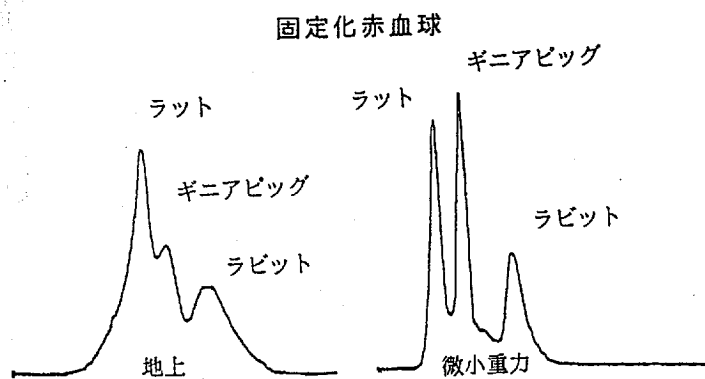


図3 微小重力における泳動分離例

がある。

宇宙空間のような微小重力下で電気泳動を行う利点の一つは、この熱対流による槽内の乱れがなくなるので、分解能が向上するとともに、試料の耐熱許容範囲内であれば槽厚を厚くすることができ、処理能力の向上を達成することができる点にある。さらに、試料と溶液の比重差に基づく問題、例えば一般に緩衝液より重い細胞等が試料の場合、地上では沈降を防ぐために蔗糖などを用いて緩衝液の比重を調整するが、動物細胞等の場合はさらに緩衝液の浸透圧も蔗糖などを用いて調整しなければならないため緩衝液の調製が難しくなる。これら熱対流、沈降及び浮上のような比重差に基づいて起こる問題は、無重力環境下では解決されることになるので、泳動試料の種類や濃度の選定がより自由となり、泳動分離能及び精製処理能力の大幅な改善につながると期待される。宇宙泳動実験の一例として、図3には K. Hannig らが行ったロケット実験結果⁷⁾を示す。微小重力環境下でラット、ギニアビッグ及びラビットの固定化赤血球の混合液を泳動分離したものであるが地上の対照実験のものより微小重力環境の方が分離度合いが鋭くなっていることがわかる。

また、このテーマでは微小重力環境で細胞培養に関し次の効果も期待される。図4には FMPT (First Material Processing Test)で三井製薬の菅沼らが行った細胞培養の実験結果⁹⁾を示す。図は免疫グロブリン M を分泌する細胞を宇宙で培養した結果と地上対照実験結果を示しているが、地上に比べて約2倍の産生量が微小重力環境で得られることが判明した。従来から浮遊性細胞は微小重力環境で産生量が増加し、反対に付着性細胞は減少すると言われている。本実験の細胞も浮遊性であるので、この菅沼らの結果より本実験の細胞培養でも産生量の増加が期待される。これら泳動分離と細胞培養の二つの効果が加算されるものと本実験では期待されていた。

泳動分離の第一次分析は 254 nm の紫外線の試料検出器を使って行なわれるが、これだけでは分離されたものを特定することはできない。このため、二次分析を行う必要がある。細胞は血球計算盤で細胞濃度を求め、たん白質は抗原-抗体反応を利用して分析する。なお、宇宙実験では細胞を保存できる -80°C の冷凍庫が搭載されていないので、細胞の評価は顕微鏡写真のみとなった。細胞培養実験の評価は、主として顕微鏡による増加状況把握と上記の抗原-抗体反応を利用して求めた。

泳動性能を向上させるには緩衝液と試料との導電率比が重要と言われている。また、緩衝液の pH 値と試料の pI 値(マウスの IgG の場合、5~7 と推定される)の差が大きいほど試料の泳動速度が大きくなる。この最適条件を探索するため、成分が

緩衝液と泳動条件の検討^{9), 10)}

泳動性能を向上させるには緩衝液と試料との導電率比が重要と言われている。また、緩衝液の pH 値と試料の pI 値(マウスの IgG の場合、5~7 と推定される)の差が大きいほど試料の泳動速度が大きくなる。この最適条件を探索するため、成分が

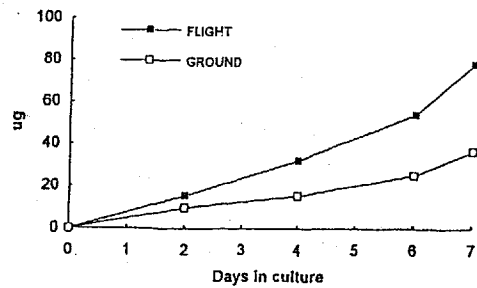


図4 微小重力における細胞培養例

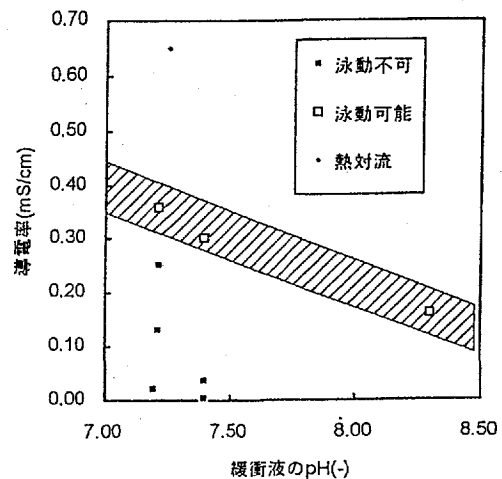


図5 緩衝液の導電率-pHの泳動可能範囲

異なる6種類の緩衝液と本実験の緩衝液であるトリエタノールアミンアセテート (TEA) 水溶液について、導電率と pH を変えて分離実験を行った。その結果が図5である。図のハッチングの部分泳動可能であった範囲を示す。実験では、TEA 水溶液 pH 8.5 以上では蛋白質が凝集して固まり試料注入口を塞ぐことが分かったので、緩衝液は TEA

水溶液 pH 8.3 とした。ここで、泳動可能範囲より上の部分は、電流値が高いため熱対流の影響を受けて乱れた可能性があり、微小重力環境では泳動可能となる可能性もあるので「熱対流で泳動不可」と表示した。

図6、図7は泳動条件設定のため地上用泳動槽 (FFEU/BBM) を利用して行った予備実験結果の一例を示す。緩衝液は TEA 水溶液 pH 8.3 で図6に試料検出器の出力経過を図7に二次分析結果を示す。これらの結果から細胞と IgG との分離を確認するとともに緩衝液の妥当性と泳動条件の適性を把握した。また、試料中の細胞を除去した試料を用いて実機である FFEU/FM により予備実験を行い図8に示す試料検出器の出力を得た。FM でも IgG の泳動移動することを確認できた。ただし、泳動時間を長くしたり電圧を上げると熱対流が発生し試料分離が困難となった。これら FFEU/BBM と FFEU/FM の予備実験結果を総合して泳動条件としては試料注入速度及び緩衝液流速を 3 ~ 4 cm/min、泳動電圧を 150 ~ 200 V とした。

CCK 性能把握とレイトアクセス対応の細胞培養条件の検討

CCK は通常使用されている市販の培養フラスコとは違い、ガス透過膜を用いて密閉構造としているため、CCK の細胞培養性能を調べた。その結果を図9に示す。通

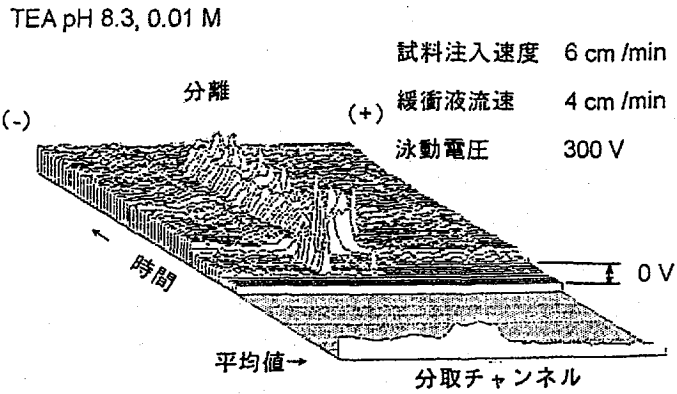


図6 試料検出器の出力結果 (地上用電気泳動装置; FFEU/BBM)

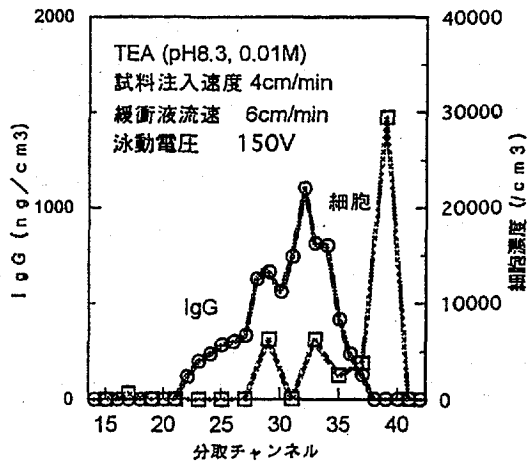


図7 二次分析結果

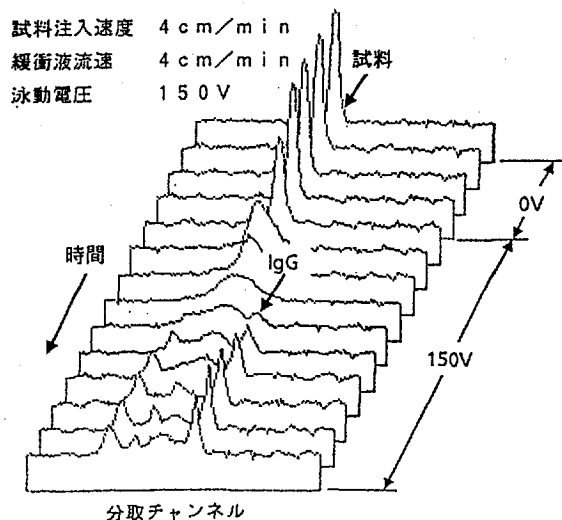


図8 試料検出器の出力結果 (宇宙用電気泳動装置; FFEU/FM)

常の培養フラスコで細胞が10倍に増殖するのに2~3日なのに対し、CCKでは4~5日と約2倍の日数がかかるが培養上問題なく培養できることがわかった。

この培養の時間的特性を把握したことで細胞培養の準備は完了したと考えていたが、宇宙実験特有の問題が発生した。すなわち、細胞試料の場合、打上げ前にミッドデッキロッカーに収納され、打上げ後インキュベータに移される。このインキュベータに移されるまで細胞にとってなんの保護もない環境に置かれる。本実験の細胞は、この環境を模擬した培養試験の結果、この1日を生き延びることができないことが判明した。このため、東京医科歯科大学の桑井先生のアドバイスに従って培地成分のうちの2成分の分量を変えた5種類の培地を用いて培養実験を行った。この実験検討により細胞が生き延びられる培地を発見することができた。この改良培地を使用し、しかも細胞が泳動されるまでに置かれる環境を模擬した実験を行い初期細胞濃度と最終細胞濃度との関係を検討した。実験では、最初の一日目温度25℃、炭酸ガス濃度0%、湿度40~50%の環境に放置し、2日目から温度37℃、炭酸ガス濃度5%、湿度90%以上であるインキュベータに入れて5日間培養した。図10はその結果で初期細胞濃度 $5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個/cm³の範囲では約6日後に2倍程度に、そして 2.5×10^5 個/cm³では4倍程度増殖することが確認できた。最初からインキュベータに入れた場合は4日間で10倍に増殖しているの、それと比べると最初の一日のダメージの大きいことが分かる。これらの実験結果及び泳動までの日数が6日となったため、7日目に最高濃度 2.0×10^6 個/cm³近くとなるように初期細胞濃度を 5×10^5 個/cm³とすることとした。

打上げ1ヶ月まえに支給された6個の飛行実験用CCKで細胞培養の試験を行い、その健全性を検討した結果を図11に示す。この結果、すべてのCCKは細胞に悪影響がないことを確認した。図12は、日

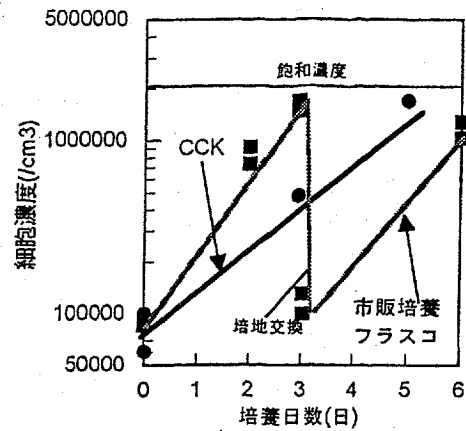


図9 細胞培養キット(CCK)培養性能

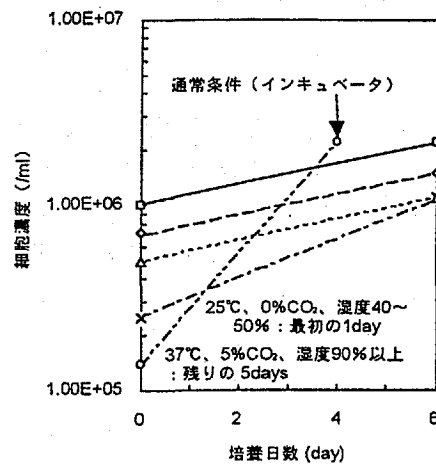


図10 打上げ環境模擬の細胞培養実験

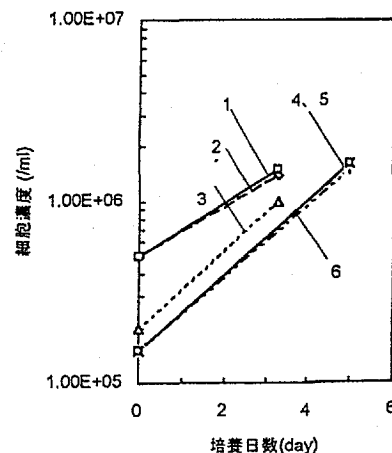


図11 細胞培養キット(CCK)の健全性チェック

本から NASA ケネディ 宇宙センターへ凍結して輸送し、その細胞を解凍して打上げまで培養したときの細胞生存率の経過で、10日で生存率が安定になり16日から生存率の変動も小さくなっており最高の条件で細胞が調製されたことを示している。

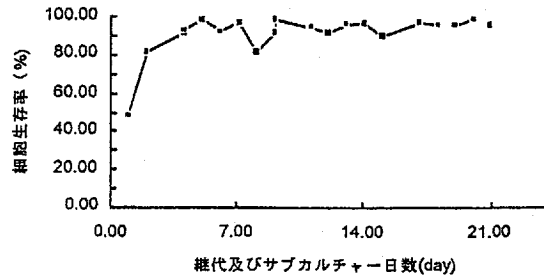


図 12 供試細胞の生存率の推移

飛行実験の結果

表 2 に実験のスケジュールを示す。当社の実験は、(a) 試料の引き渡し、(b) 試料の培養、(c) 試料の泳動分離、(d) 試料の冷蔵保存及び (e) 分取試料の冷凍保存の順にハッチングしたバーで示したスケジュールで行われた。当初、白抜きのバーで示したスケジュールで行われる予定であったが、FFEU/FM の冷却システムの不具合により電気泳動システムとして起動できない状態が生じた。この原因は、冷却水系統に残留した気泡によって冷却水ポンプが空回りし、冷却水圧力が規定値に達しなかったためである。修復作業が予想以上長引き、当社の試料の実験ができるようになるまでに約 5 日間かかった。培養を継続すると、細胞が増え過ぎて死滅し、その影響で IgG も消滅する恐れがあったため、非常措置として予定にない冷蔵保存(5℃)を 5 日間行った。このため、細胞の大半が死滅するなど、かなりの影響を受けた。この事故により、予備泳動実験が不可能になり、1 回の本泳動実験のみの実施となった。また、修復作業の影響で今度は泳動槽内に気泡が混入し、このため有効な泳動範囲がかなり狭くなるなどの影響を受けたものの、泳動分離状況を試料検出器で把握することができたので、部分的ではあるが所期の目的を達成することができた。

表 2 実験スケジュール

項目	月日	7/7	7/8	7/9	7/10	7/11	7/12	7/13	7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24		
メインスケジュール			↓ 打ち上げ ↓														↓ 着陸 ↓				
試料(細胞培養液)の引き渡し		□	☒														□		☒		
試料の培養(恒温恒湿槽内)			▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬		
試料の冷蔵保存								▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬	
試料の泳動分離									□								☒				
分取試料の冷凍保存								▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬	

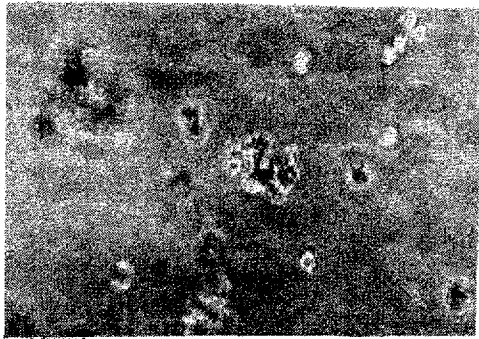


図13 泳動前細胞(軌道上)

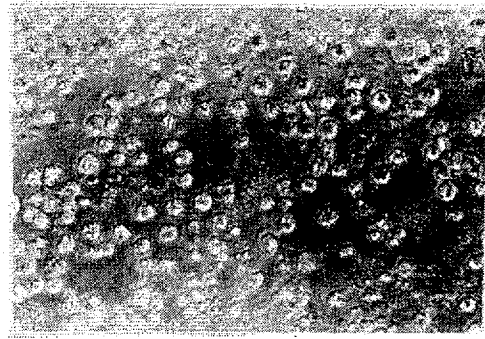


図14 泳動前細胞(地上対照)

泳動前の細胞の状況

図13は、MET Day 11 (7月19日)に軌道上で撮影の顕微鏡写真である。この焦点ぼけの原因は、微小重力環境ではCCK細胞培養容器内での細胞の浮遊と振動のためと報告されている。しかし、細胞が形を保って存在しているのは少なくとも確認できる。図14は、地上対照の顕微鏡写真でこちらも細胞の形を保持しているものが多くあるものの、その間に細胞が崩壊したと考えられる微小な粒が見られる。この地上対照の細胞は細胞濃度 $1.9 \times 10^6 / \text{cm}^3$ で生存率 15% であった。これらのことと後で述べる細胞分泌物の量から細胞は軌道上でも泳動試料として存在していたと考える。

飛行中泳動実験の状況と結果

図15は、泳動実験の開始前に試料検出器に出力された紫外線の発光度分布で、本来であれば端から端まで光度は0.7~0.8となる。しかし、16チャンネルから53チャンネルの光では低い値が出ている。これは、この部分に水よりも光を吸収しない物質、すなわち気体の存在する可能性を示していた。着陸後の調査で気泡の存在が確認された。この気泡は、図16のように泳動槽内に存在し緩衝液の流れを狭い範囲に押し込んだと推定している。

図17は分取容器に分取された

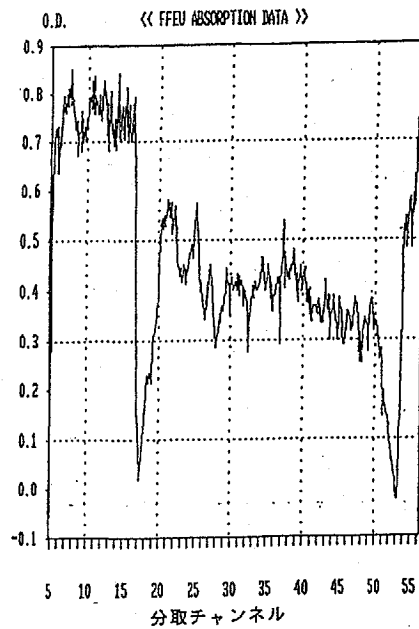


図15 試料検出器の参照データ

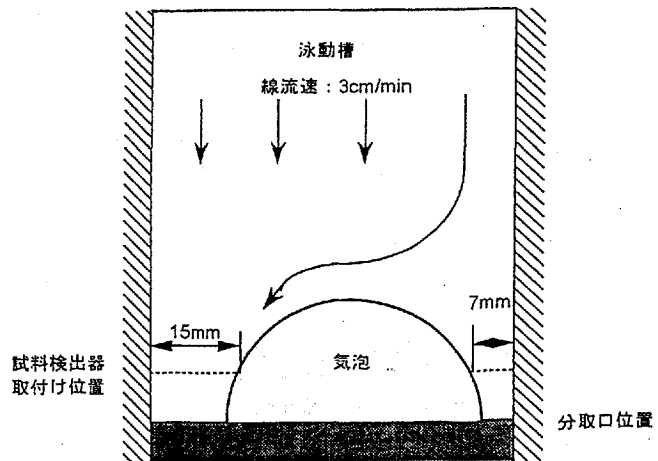


図16 泳動槽内状況の推定図

試料の量を調べたものである。規定値(2.5 cm³)以上のものもあるが、ほとんどは本来入るべき液体の分量に達していない。又、泳動実験が始まってから気泡の存在に気付いたものの確信のない状況で分取容器を付けるべきチャンネルを決めたので泳動試料を取り損なった面もあり二次分析ではなにも検出できなかった。検出できたのは多量に確保できた泳動前の試料である細胞培養液のみであった。

図 18 は、泳動実験を始める前に試料検出器のバックグラウンドを引いた吸光度の出力状態である。17チャンネル及び53チャンネル付近

には+-のピークが現われており、これはバックグラウンドを引いても気体と液体との界面では光の反射・吸収の不連続性が著しいため現われたものであり、着陸後の装置の飛行後解析で確認された。図 19 は、泳動電圧 150 V、試料流速 3 cm/min、緩衝液流 3 cm/min のときの試料検出器出力であり、気泡のない17チャンネル以下に注目すると少なくとも3つのピークが見られる。採取量不足のため二次分析ができなかったたので断定はできないが、10チャンネル付近が死細胞の残骸、12チャンネル付近が細胞で、15チャンネル付近がIgGと推定する。

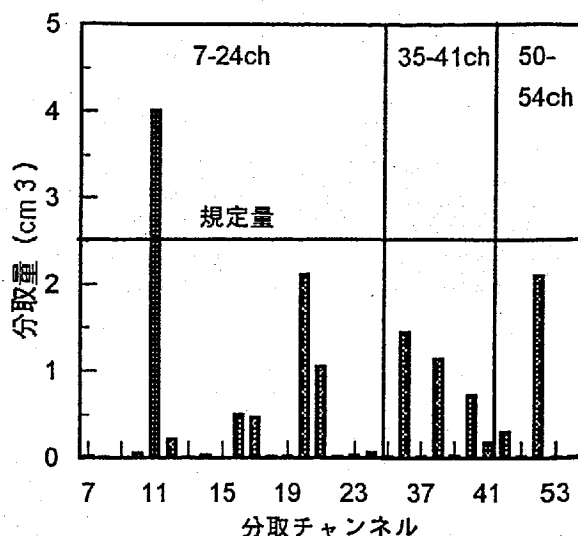


図 17 分取容器の分取状況

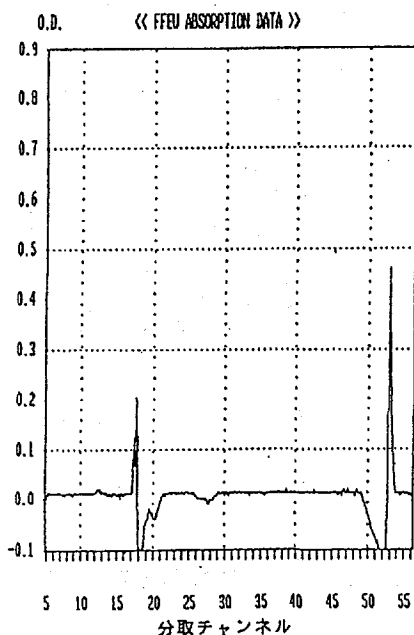


図 18 泳動前の試料検出器出力

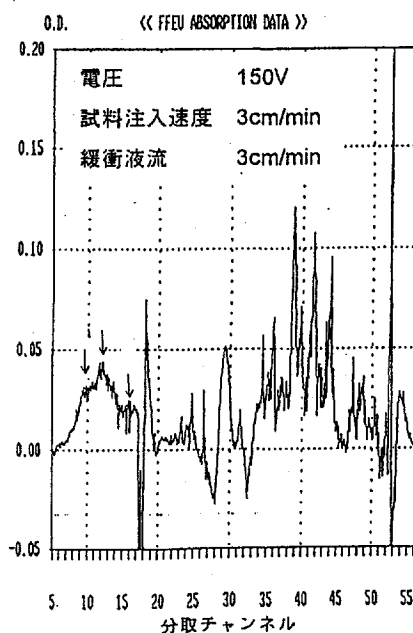


図 19 泳動中の試料検出器出力

図 20 は本泳動実験の後に行うことができた追加実験の結果を加えたもので、電圧を変えた場合の泳動状況調べた結果を示す。電圧 0 V では試料が 12 と 13 チャンネルの間に試料のピークが現れているのが、150 V では 3 つに分離し、200, 300 V では昇圧とともにピークが小さくなっている。これは、電圧とともに泳動距離が大きくなり、分離された試料が 5 ~ 17 チャンネルより外側へ移動したものと推定する。

一方、気泡が存在する 17 ~ 53 チャンネルを見ると電圧の上昇とともに吸光度が増加しており、この理由は、ジュール熱の増加により気泡界面から気泡内への蒸発量が増えるので、泳動槽の冷却壁面で水蒸気が凝縮して形成された水滴が大きくなり、吸光度が上昇したと考えるが、詳細は不明である。

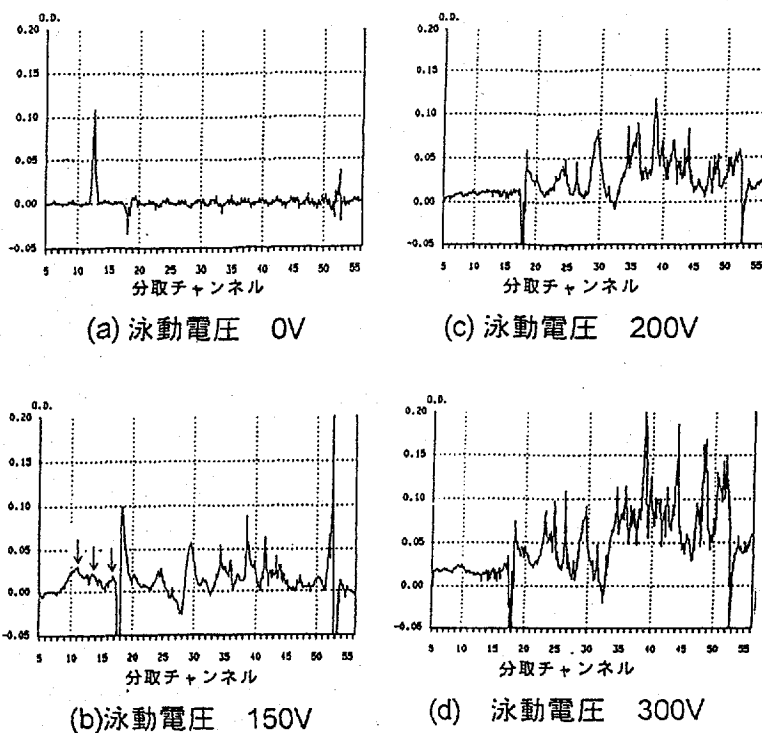


図 20 泳動電圧の泳動状況への影響

解析と考察

図 21 は、微小重力環境で培養された細胞と地上対照実験で培養された細胞が分泌した IgG の量を分析し対比したものを示す。地上で培養されたもののほぼ 2 倍の IgG を宇宙で培養されたものは分泌している。菅沼らとは異なる細胞であるが同じ結果を確認している。

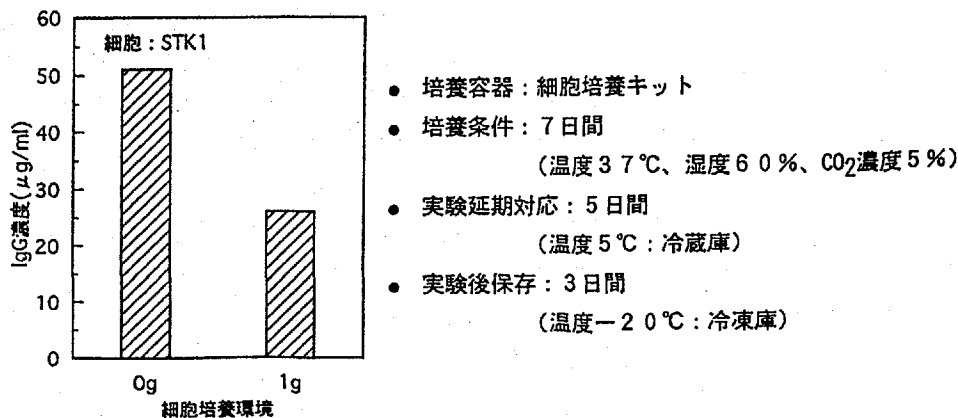


図 21 微小重力環境の細胞産生への影響

試料流速及び緩衝液流速：3 cm/min

有効泳動範囲：0～17チャンネル（地上は、0～60チャンネル）

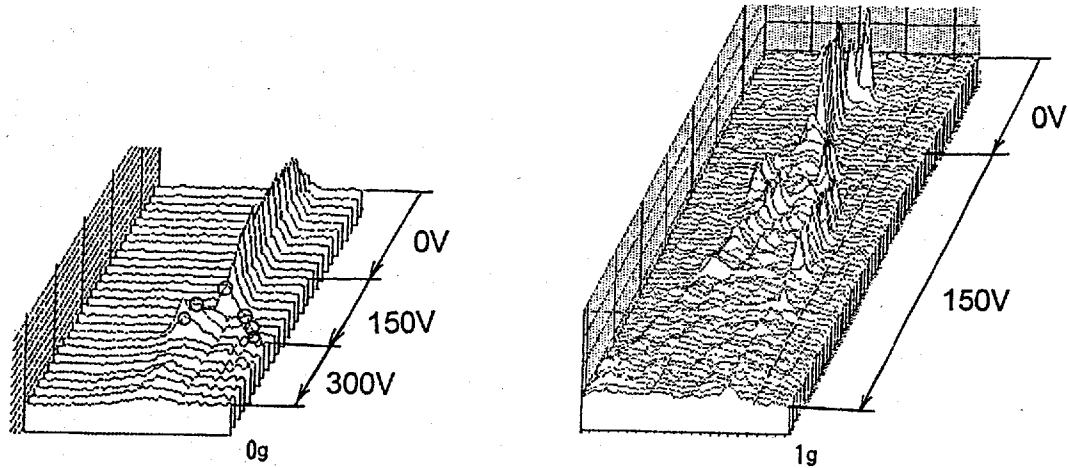


図 22 微小重力環境と地上との泳動分離状況の比較
(試料検出器の出力結果)

これは、細胞の種類が異なるものの浮遊性細胞として同じメカニズムで有用物質を産生しているためと考える。浮遊性細胞といっても培養液よりも比重が若干大きいため地上では培養フラスコの底に密集して沈んでいるので、栄養分や酸素等を取り込める環境は細胞の上の環境のみであるのに対し、微小重力環境では3次的に分散できたので全方向の環境が対象となるためと推察するが詳細は不明であり今後のメカニズムの解明が期待される。このメカニズム如何によっては、当社の開発したバイオリアクタ技術と組み合わせることにより約40倍の細胞分泌物を得ることも可能性があると考えられる。

図 22 は、試料検出器の出力の時間変化を比較したもので左図は、飛行中実験の結果を泳動が行われた0～17チャンネルに注目して抽出したものであり、右図は、地上で予備試験として FFEU/FM を使って行われたときのものを示す。但し、地上の実験では試料は細胞を除去した培養液であり、本 FM は、地上では熱対流が発生するため泳動できる範囲が限られているが泳動槽の作動性確認のため泳動実験が行われた。このため、地上の出力は、泳動電圧 0 V でも泳動槽の冷却に起因すると考えられる部分的密度流で、最初のうちは、試料のピークが左右に振れている。泳動電圧が印加された状態では、熱対流の原因となる加熱が行われるため緩衝液の温度が徐々に上昇する。緩衝液温度が上昇すると、緩衝液の導電率が高くなるためさらに電流が増え加熱量が増え緩衝液の温度が上がるという循環になり部分的な熱対流の影響がでる。これに対応する試料のピークは、右方向に泳動しながら左右上下に振れている。しかし、泳動槽の形状、寸法、緩衝液の熱流体的物性より決まる臨界温度を越えると全面的に熱対流が発生し試料のピークは、拡散し最終的に消滅している。これに対し左図は、泳動槽内に混入した気泡の影響で泳動場が狭められ、しかも流れ場としては非対称形になるという悪い状況にも拘わらず、泳動電圧 0 V のときの試

料のピークは、高さ、位置ともかなり安定しており、微小重力の効果が出ている。又、図 23 は、図 22 の左図を前から見たもので泳動電圧 0 V のときの試料注入の安定性が分かる。また、見にくいので○印で示すが泳動電圧 150 V のとき IgG と考えられるピークが右に、細胞の崩壊した後の破片と考えられるピークが左に泳動している。しかし、この後の泳動電圧 300 V への昇圧で IgG と考えられるピークはさらに右に移動しこの泳動場の外に出た。又、細胞の崩壊した後の破片と考えられるピークはさらに左に泳動し、正常な泳動ができない電極の影響域(電極から 5 mm ~ 10 mm)に入り拡散したものと考える。これらから、地上と比べると熱対流がないお陰で分離能が著しく向上できることが示唆される。今後のさらなる宇宙泳動実験の継続を期待する。

試料流速及び緩衝液流速：3 cm/min

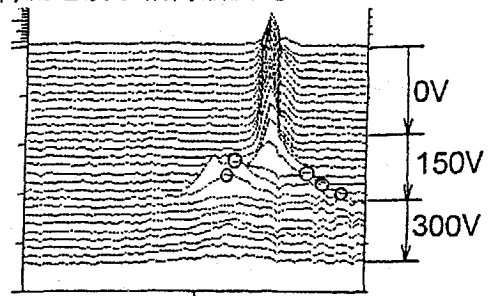


図 23 微小重力環境の泳動分離状況
(図 22 の左図の正面から見た図)

結論

分離精製性能の向上を期待される宇宙用電気泳動実験で有用物質を分泌する細胞培養液を泳動分離する実験を行った。シャトルの打上げ後、地上対照実験を行いながら軌道上泳動実験に参加するとともに持ち帰った試料を分析し、次のことを明かにした。

- 1) 泳動槽の内部に気泡が存在していたものの、気泡の存在しない部分では局所的に泳動分離が生じており、この領域で泳動分離が行われたことが試料検出器により把握できた。この泳動が行われた範囲では、試料が熱対流の影響を受けないため地上実験結果と比較して試料の泳動場での安定性が著しく高いのを確認できた。これは、間接的ながら泳動分離が著しく向上するのを示していると考えられる。
- 2) 凍結保存した状態で日本から NASA ケネディ宇宙センターに運んで解凍して培養を行った細胞は、培養開始後約 1 週間で増殖速度が通常の数値に回復し、16 日目で細胞生存率が 90 % 以上に達して安定することを確認した。
- 3) 打上げ後、6 日培養された細胞は予定と異なり、その後泳動まで冷蔵庫に 5 日間保存された。この宇宙と同じ条件で地上対照実験で培養された細胞は、細胞濃度 1.9×10^6 (/cm³) で生存率 15 % であった。顕微鏡写真を見る範囲では、宇宙でも細胞の形状を保ち泳動可能な状態であったと考える。分析の結果、宇宙で培養した細胞は、地上で培養した地上対照実験細胞の約 2 倍の IgG を分泌していることが分かった。これらから、宇宙での培養と電気泳動を組み合わせることにより薬品の生産量を大きく向上できるものと考えられるので、さらに宇宙実験でそれぞれの分野で詳細なデータの蓄積が国際協力のもと行われることを期待する。

参考文献

- 1) Hitachi, Ltd. System for Culturing Animal Cells in High Concentration. *JETRO*. 88-10-004-254 (October 1988).
- 2) 三上定夫. バイオセパレーション, CMC (1985).
- 3) 青木幸一郎. 最新電気泳動法, 広川書店 (1978).
- 4) Hannig, K. et al. *Free-flow Electrophoresis*, GIT Verlag (1990).
- 5) McDonnell Douglas. *Feasibility of Commercial Space Manufacturing (Production of Pharmaceuticals) Final Report Vol. 2*, NASA-CR-161325 (1978).
- 6) Hannig, K. et al. Eine Neuentwicklungen der Traegerfreien Kontinuierlichen Electrophorese. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiol. Chemie.* 338, 211-227.
- 7) Hannig, K. et al. Free-flow electrophoresis under microgravity: Evidence for enhanced resolution of cell separation. *Electrophoresis.* 11, 601-604 (1990).
- 8) 宇宙開発事業団. 宇宙開発事業団技術報告, ふわっと'92 宇宙実験成果報告 ライフサイエンス編 (1994).
- 9) Perrin, D. D. et al. *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall (1974).
- 10) Rhodes, P. H. et al. Electrohydrodynamic Distortion of Sample Streams in Continuous Flow Electrophoresis. *Journal of Colloid and Science.* Vol. 129.

外部発表

- 1) Okusawa, T., Kojima, Y., Tsubouchi, K., Hamano, N. and Takagi, Y. Investigation on Electrophoretic Separation of Cell Culturing Suspension for IML-2. *Proceeding of 18th International Symposium on Space Technology and Science*, Kagoshima (1992). 2229-2234.
- 2) 奥沢 務, 芳賀良一, 坪内邦良, 浜野亘男, 高木勇輔. 第二回国際微小重力実験室での泳動分離のための地上予備検討. 第37回宇宙科学技術連合講演会講演集 (1993).
- 3) Okusawa, T., Tsubouchi, K., Haga, R., Kanakubo, T., Takagi, Y. and Hamano, N. Preliminary Terrestrial Investigation on Electrophoretic Separation for IML-2. *19th International Symposium on Space Technology and Science* (1994). 94-h-22.
- 4) 奥沢 務, 坪内邦良, 芳賀良一, 石川孝一, 長岡俊治, 加藤充康. 動物細胞培養液の泳動分離実験. 日本機械学会第72期通常総会講演会先端技術フォーラム15「IML-2からの機械技術者の教訓」(1995).