

微小重力下における細胞培養容器への 溶液注入・採取試験

Injection and Collection of Fluids into Cell Culture Chamber
under Microgravity

渋川 喜和夫 ⁽¹⁾	長岡 俊治 ⁽¹⁾	宇佐美 論 ⁽¹⁾	村上 敬司 ⁽¹⁾
Kiwao Sibukawa	Syunji Nagaoka	Ron Usami	Keiji Murakami
高沖 宗夫 ⁽²⁾	御所園 利美 ⁽²⁾	上村 一秀 ⁽²⁾	
Muneo Takaoki	Toshimi Goshozono	Kazuhide Kamimura	

(1) 宇宙開発事業団

National Space Development Agency of Japan

(2) 三菱重工業株式会社

Mitsubishi Heavy Industries, Ltd.

ABSTRACT

The handling of fluids was tested during parabolic flights, to obtain basic designing data for the development of the Cell Culture Facility for the Japanese Experiment Module (JEM). Fluids mimicking culture media were injected into or drawn from cell culture chambers of various sizes and shapes. The results showed that the air/liquid interface could be maintained undamaged under the microgravity condition, when the thickness of the chamber and the flow rate of the fluid were appropriately selected. This suggests that the air inside the chamber can be replaced by the fluid or vice versa, permitting medium exchange and other handling procedures become easier and simpler.

1. 緒言

宇宙ステーション日本モジュール(JEM)には細胞培養装置の搭載が計画されている。細胞培養装置では動物細胞、植物細胞、微生物を始めとする各種細胞の培養実験が行われる。細胞培養実験では細胞懸濁液を遠心分離して上清を取り除き、細胞に別の溶液を加える操作が頻繁に行われる。付着性動物細胞の植え継ぎではこの操作を5回以上連続して行うので、遠沈管やピペット等の器具が多数必要で、補給・保管量の制約が厳しいJEMで実施すると実験テーマ数の減少につながる。そこで、我々は細胞培養容器の中にフィルタを設けて細胞と溶液とを分離することを検討している。このフィルタによる分離では古い液を培養容器から完全に取り除き、新しい液で培養容器を満たさなければならないが、このためには気液界面を利用して液を採取・注入しなければならない。

重力のある地上では気液界面の形成は容易であるが、微小重力であるJEMでは界面が安定しないと考えられがちである。しかし、静置状態であれば液体と気体との接触角が90°付近

になると重力変化に伴う気液界面形状変化が小さくなることが知られている⁽¹⁾。また、内径5mm程度の細管であれば加振しても表面張力によって地上と同様に安定することが航空機実験により確かめられている⁽²⁾。よって、培養容器を十分薄くすれば気液界面を維持して溶液を注入・採取できると期待される。

微小重力下で細胞培養容器内の溶液を置換する技術開発の第1段階として、気液界面を維持しながら溶液を注入・採取できることを検証することとした。そこで、微小重力時間中に実験状況を確認しながら多数のパラメータを適宜変更できる航空機実験を行った。

2. 実験方法

2. 1 実験項目

微小重力下で、培養容器に対して液体を注入あるいは採取し、特に気液界面の状態と気泡の発生に注目して容器内の溶液の挙動を観察した。

2. 2 実験試料

細胞培養実験で使用する細胞培養液、細胞を容器から剥すトリプシン液等はほとんどが水溶液で、これら水溶液の密度、表面張力などの物性値は同程度である。細胞培養液は常温で長時間保管すると変性して物性が変わるので、純水及び純水をメチレンブルーで着色した液を主として実験試料として使用した。

表1 溶液の物性値

Table 1 Properties of Solutions

試験項目		試料名	蒸留水	メチレンブルー水溶液 ¹⁾	メチレンブルー水溶液 ¹⁾ + 洗剤 ²⁾	MEM培地
密度 (Kg/m ³)	24℃ ³⁾		997.1	997.5	1006.4	1004.0
	37℃ ³⁾		993.7	994.5	1002.2	1001.8
動粘度 (mm ² /s)	24℃ ³⁾		0.9080	0.9147	0.9343	0.9103
	37℃ ³⁾		0.7211	0.7137	0.7384	0.7223
表面張力 (Kg/s ²)	24℃ ³⁾		0.072	0.069	0.036	0.071
	37℃ ³⁾		0.071	0.064	0.031	0.070
接触角 (シリコン) (度)	24℃ ³⁾		112	109	70	112
	37℃ ³⁾		111	109	63	110
接触角 (ポリカーボネート) (度)	24℃ ³⁾		77	71	22	76
	37℃ ³⁾		78	70	21	69
接触角 (テフロン) (度)	24℃ ³⁾		99	100	57	105
	37℃ ³⁾		99	104	51	99

注 1) メチレンブルー水溶液 (濃度 $1.75 \times 10^{-2} \text{g/l}$)

注 2) 洗剤 (濃度 1 w/w%) (成分: 高級アルコール系アニオン活性剤、ノニオン活性剤、蛋白質分解酵素、炭酸塩、キレート剤)

注 3) 24℃: 平均的な航空機実験温度、37℃: 動物細胞及び一部微生物の培養温度

また、細胞培養液にはタンパク質が含まれることも多く、このような液では発泡し易くなるので、メチレンブルー水溶液に洗剤を加えたものも使用した。

これら試料の主な物性の実測値を表1に示す。

2. 3 実験条件

航空機実験では図1に示す涙滴型細胞培養容器を使用した。この容器では2枚の透明な板の間に細胞を培養する空間があり、ここに細胞培養液が満たされる。容器の両端には溶液・気体の注入・採取口がある。航空機実験では、容器材質を始めとする以下の条件を変化させて気液界面を維持しながら溶液を注入・採取するためのデータを取得した。

- ① 容器材質 : 表2に示す。
- ② 容器厚さ(t) : 3, 4, 7, 10 mm
- ③ 注入・採取速度 : 10~70ml/min
- ④ 角度(a°) : 20~60°

表2 容器材質(組み合わせ)

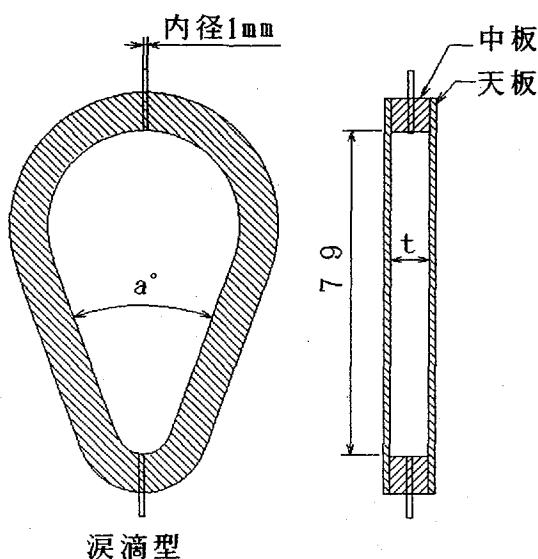
Table 2 Combinations of Materials

No	天板 (観察面)	中板 (側胴部)
1	ポリカーボネート	シリコンゴム
2	ポリカーボネート	ポリカーボネート
3	ポリカーボネート	テフロン
4	テフロン	テフロン

2. 4 実験装置

実験装置全体の写真を図2に、装置の系統図を図3に示す。

培養容器には試料容器、ポンプ、三方弁、廃液容器及び空気容器が接続されている。1台のビデオカメラで2個の培養容器を観察する。培養容器後方にはLEDを平面上に並べた照明が設置してあり、透過光方式により試料溶液の挙動は観察される。照明とは別に、実験支援システムから実験開始信号が出力されている間点灯するLEDランプを設置して、微小重力になっていることを画面上で確認で



注) 突起は試料の出入口を示す。

図1 培養容器概念図

Fig.1 Conceptual Draw of Cell Culture Chamber

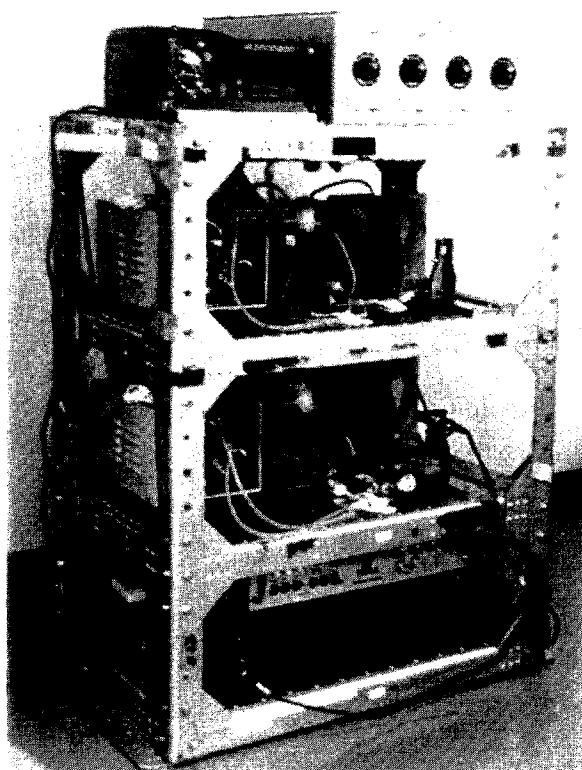
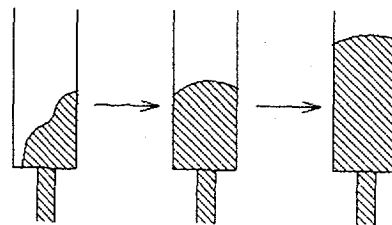


図2 実験装置写真

Fig.2 Photo of Apparatus

This document is provided by JAXA.

ると、溶液はいったん片方の天板にだけ接触して広がり、ある程度溶液が入ってから反対側の天板にも接触した（図7）。



3. 3 注入・採取速度

注入速度が10ml/minでは注入直後から気液界面を維持していたが（図6）、

20ml/min以上では溶液が噴水状に飛び出したり（図8）、容器の片側に片寄ったりした。このような現象が起こると、注

入口付近に気泡が残ったり、あるいは溶液が注入される際に注入口付近の気体を巻き込むため溶液中に多数の小さな気泡が混入したりすることになる。ただし、あらかじめ注入口から10mm位まで溶液を入れておくと、70ml/minまでの流量であれば気液界面を維持して溶液を注入することができた。

採取時でも注入時と同様の傾向が認められた。

採取速度が10ml/minでは採取直後から気液界面を維持していたが（図9）、40ml/minでは採取開始時に多数の小気泡を巻き込んだ（図10）。ただし、あらかじめ採取口から10mm位まで溶液を抜いておくと、70ml/minまでの流量であれば気液界面を維持して溶液を採取することができた。

ただし、洗剤入り溶液では注入・採取操作及び流量に関係なく多数の気泡が混入した。

3. 4 角度

角度20～60°の範囲では気液界面の挙動には有意差は認められなかった（図11）。

図7 厚さ7mm以上の容器での注入時の溶液挙動
（容器側面から観察した場合の状況を推定）
Fig.7 Behavior of Solution during Injection
in a 7mm Thickness Chamber

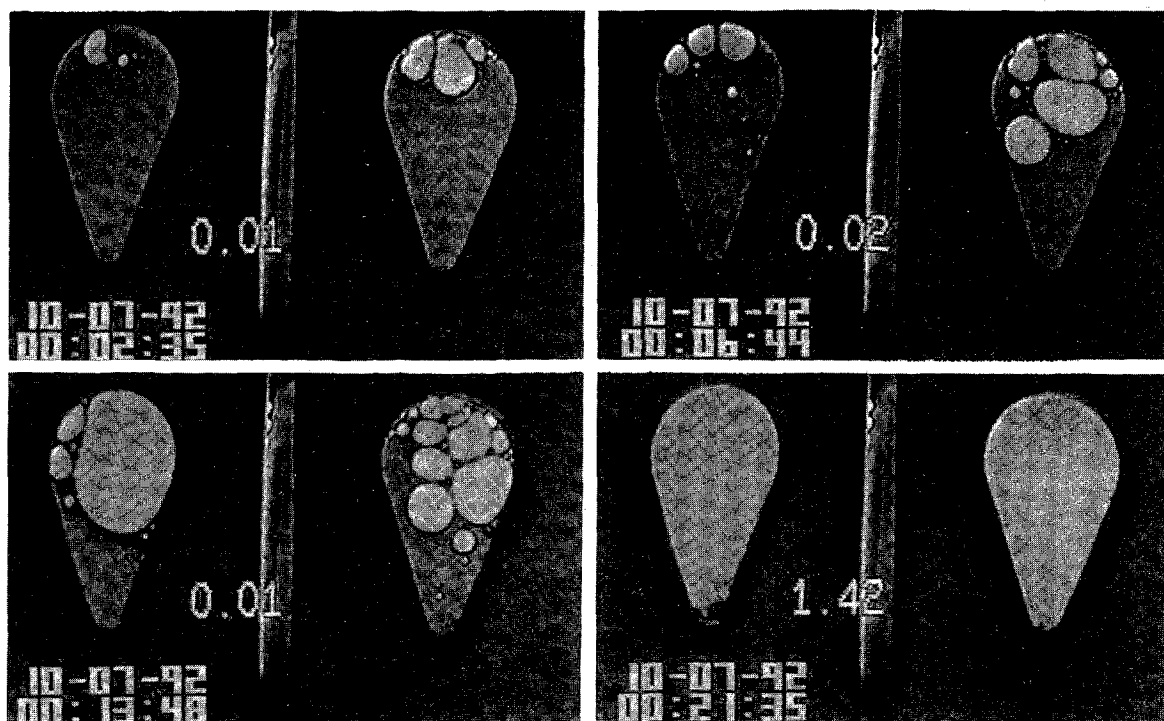


図4 発泡性溶液での採取操作
Fig.4 Collection of Foamy Fluids

材質	左側	右側
天板	ホリカーホネット	ホリカーホネット
中板	ホリカーホネット	シリコゴム

操作：採取、角度：40°、厚さ：4mm、
流量：40ml/min、実験試料：メタンブル水溶液＋洗剤
注）画面中央の数字は図で下向き方向の重力を示す。

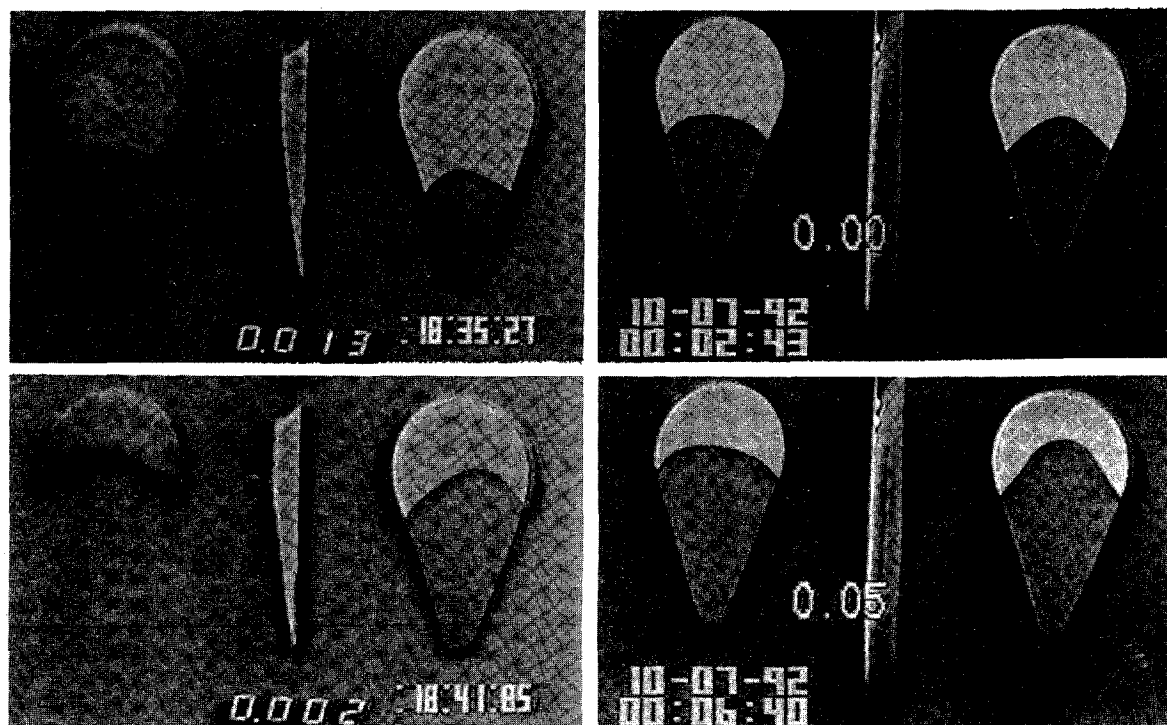


図5 材質の影響
Fig.5 Influence of materials

材質	左端	左から2個メ	右から2個メ	右端
天板	テフロン	ホリカーホネット	ホリカーホネット	ホリカーホネット
中板	テフロン	テフロン	ホリカーホネット	シリコゴム

操作：注入、角度：40°、
厚さ：4mm、流量：40ml/min
実験試料：メタンブル水溶液

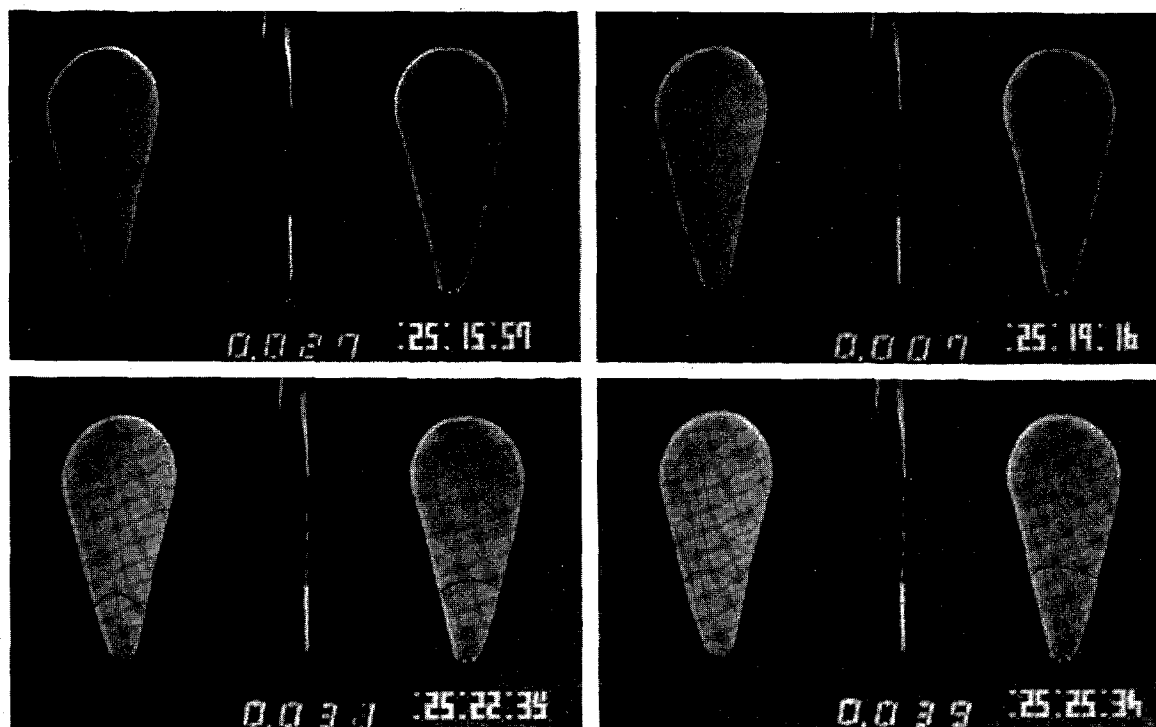


図6 容器厚さの影響

Fig.6 Influence of Thickness

	左側	右側
厚さ	3mm	4mm

操作：注入、角度：30°、材質：(天板)ポリカーボネート、(中板)シリコン
流量：10ml/min、実験試料：蒸留水

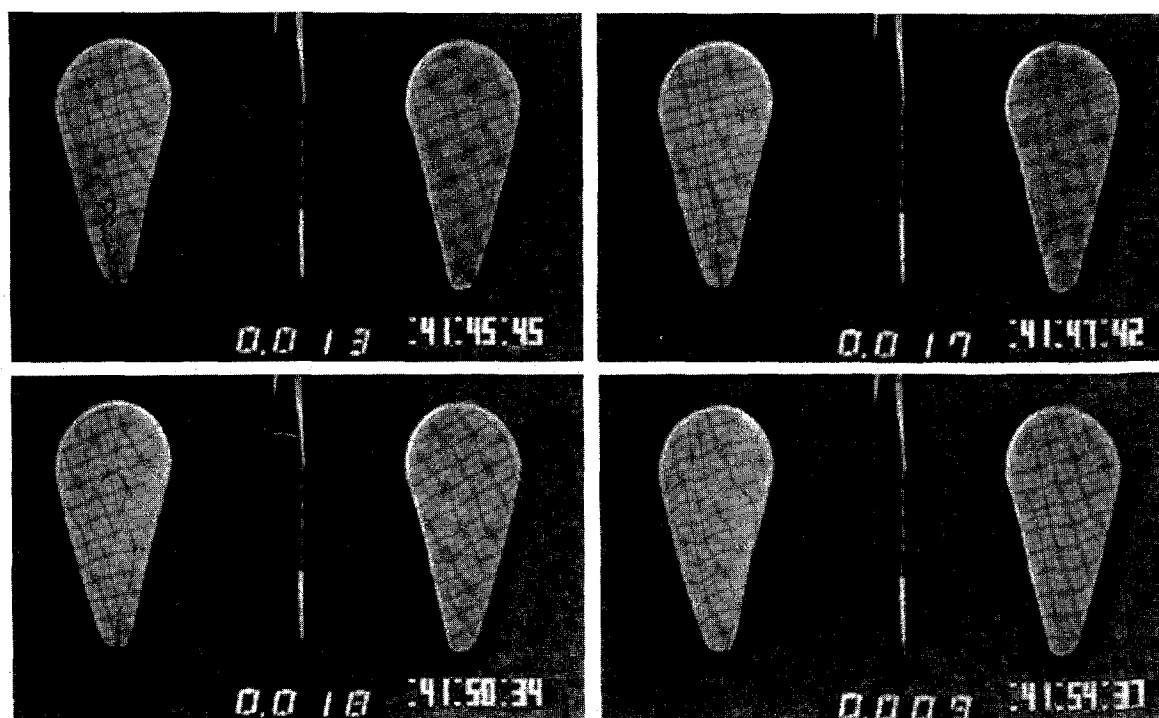


図8 注入速度の影響

Fig.8 Influence of Injection Speed

	左側	右側
速度	3mm	4mm

操作：注入、角度：30°、材質：(天板)ポリカーボネート、(中板)シリコン
流量：20ml/min、実験試料：蒸留水

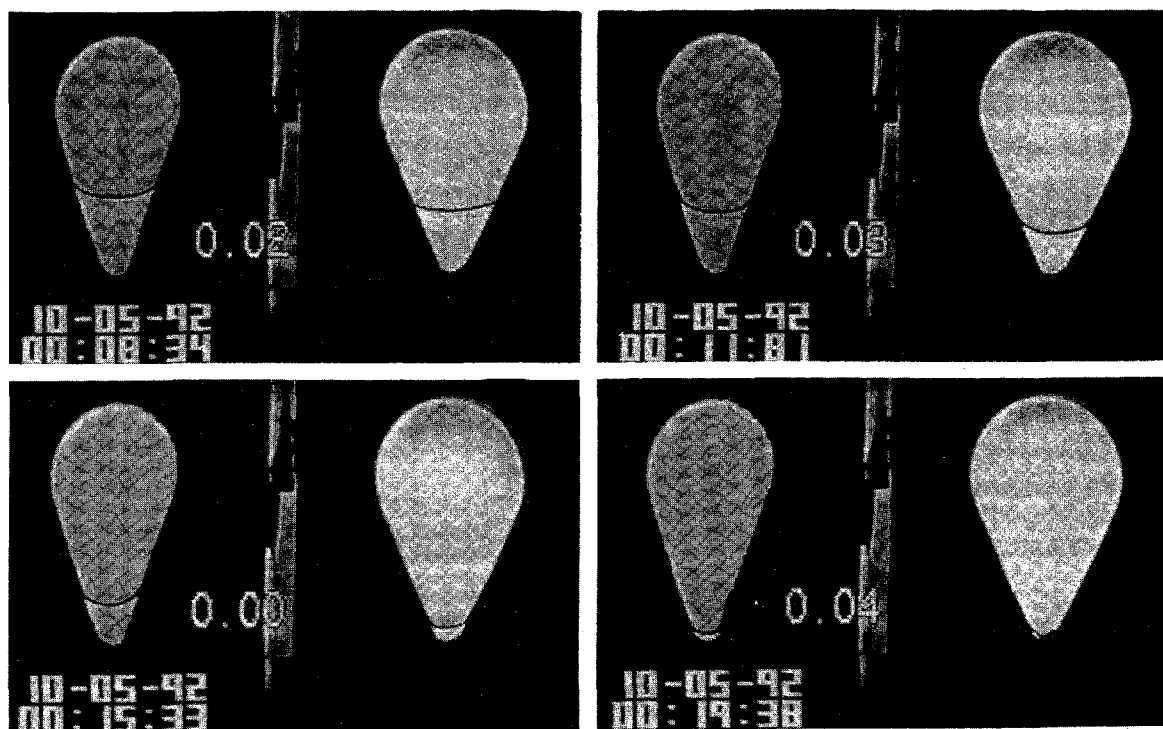


図9 ゆっくりした速度での採取操作

Fig.9 Collection of Fluid in Low Speed

	左側	右側
角度	40°	50°

操作：採取、厚さ：4mm、材質：(天板)ポリカーボネート、(中板)シリコンゴム
流量：10ml/min、実験試料：蒸留水

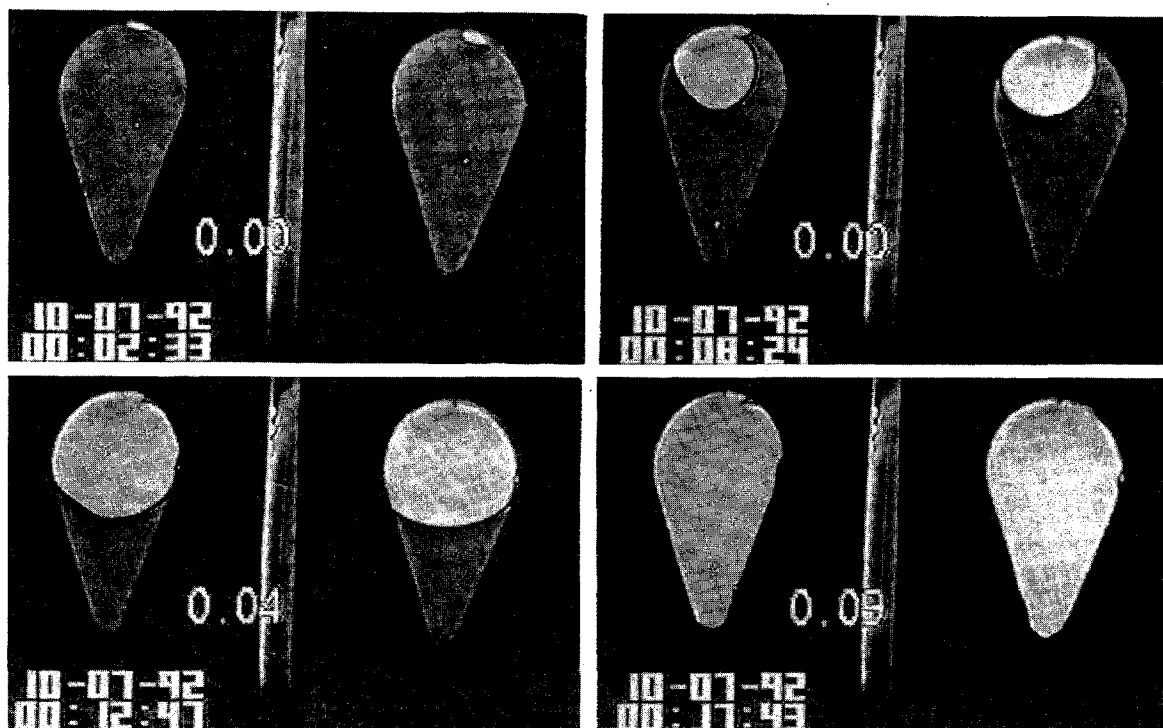


図10 速い速度での採取操作

Fig.10 Collection of Fluid in High Speed

材質	左側	右側
天板	ポリカーボネート	ポリカーボネート
中板	ポリカーボネート	シリコンゴム

操作：採取、角度：40°、厚さ：4mm、
流量：30ml/min、実験試料：メタノール水溶液

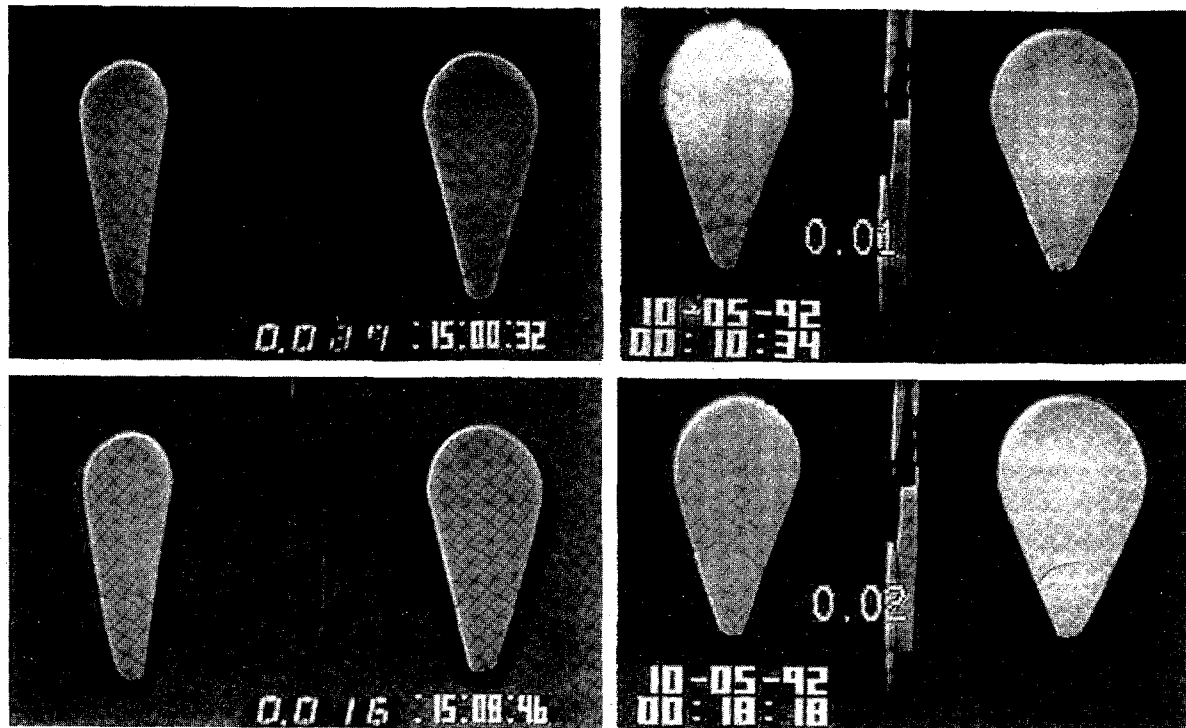


図 1 1 角度の影響

Fig.5 Influence of Angle

	左端	左から2個メ	右から2個メ	右端
角度	20°	30°	40°	50°

材質：（天板）ホリカーボネート（中板）シリコンゴム、

操作：注入、角度：40°、
厚さ：4mm、流量：40ml/min
実験試料：蒸留水

4. 結言

以上の検討から、航空機実験の結果は次のようにまとめられる。

(1) 蒸留水等のさらさらで非発泡性の液の場合

① 容器材質

4種の容器材質組み合わせの間では気液界面の安定性に大きな差はなかった。

従って、容器材質は培養する細胞の特性によって選定すべきである。

- ・ポリカーボネート(天板)+シリコンゴム(中板)
- ・ポリカーボネート(天板)+ポリカーボネート(中板)
- ・ポリカーボネート(天板)+テフロン(中板)
- ・テフロン(天板)+テフロン(中板)

② 容器厚さ

容器厚さは4mm以下が望ましい。

③ 注入・採取速度

注入採取初めはゆっくりした速度で行う必要がある。航空機実験で使用した内径1mmの配管の場合は、初期5秒間に10ml/minの低流量で流すことが必要であった。その後は増大でき、最大70ml/minまで問題ないことを確認した。内径1mmでの流量10ml/minを流速に換算すると21cm/secになり、最大流量70ml/minを流速に換算すると149cm/secになる。従って、内径の異なる配管でもこの流速条件を満たせば、気液界面を維持しながら溶液の注入、採取が可能と考えられる。

④ 角度

角度は気液界面の安定性にはほとんど影響しない。(20~60°)

(2) 洗剤入り溶液のような発泡性溶液の場合

10ml/minという小流量で溶液を注入・採取した場合でも、気液界面は揺れて安定性に欠け、大小多数の気泡が混入した。これは蒸留水などの場合に気液界面が安定した流量である。従って、発泡性溶液の場合は気液界面を利用せずに溶液を注入・採取する方法を検討すべきである。

謝辞

航空機実験の実施に当たって、多大なご協力を頂いたダイヤモンドエアサービス株式会社の皆様のご厚誼に対し、深く感謝いたします。

参考文献

- (1) 小野 周 "表面張力" 共立出版
- (2) 清水盛生、長岡俊治、宇佐美論、奥山典生、高沖宗夫、上村一秀、小林次郎、大山勝、福井正洋、石倉精三、宇宙生物科学、Vol.6 No.2 (1992) pp.146-160