

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（その2）

Injection and Collection of Fluids into Cell Culture Chamber
under Microgravity (No.2)

長岡 俊治(1)	山脇 敏彦(1)	村上 敬司(1)
Syunji Nagaoka	Toshihiko Yamawaki	Keiji Murakami
高沖 宗夫(2)	御所園 利美(2)	根岸 成昭(2)
Muneo Takaoki	Toshimi Goshozono	Nariaki Negishi
上村 一秀(3)	梶村 勉(3)	
Kazuhide Kamimura	Tsutomu Kajimura	

- (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.
- (3) 株式会社神菱ハイテック
Shinryo High Technologies, 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 simulating culture media were injected into or drawn from cell culture chambers which were partitioned into two rooms by one porous filter. The results showed that the air/liquid interface could remain undisturbed under the microgravity condition, when one room has one injection/collection port and another has two injection/collection port. 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。我々はこの操作を微小重力下で実施するために細胞培養容器の中にフィルタを設け、細胞と溶液とを分離することを検討している。

細胞培養容器内の溶液を注入・採取する場合、地上では気液界面を形成した操作が一般である。重力のある地上では形成が容易な気液界面も、微小重力下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⁾。更に、前回の航空機による微小重力実験では容器を約4mmまで薄くすれば気液界面を維持して溶液を注入・採取できることを確認している⁽³⁾。

今回は、前回実施した航空機実験の成果をベースとして、微小重力下で気液界面を維持しながらフィルタとなる膜を介した溶液の注入・採取技術を検証する目的で実験を行った。

2. 実験方法

2. 1 実験項目

- (1) 培養容器に対する溶液注入・採取時の膜を介した溶液の移動、気液界面の状態等の観察
- (2) 手動操作器具による操作確認

2. 2 実験試料

実験試料として以下の溶液を使用した。

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

メチレンブルーで着色した純水を実験試料として主に使用した。

- ② MEM培地 (培地10%量の牛胎児血清(UBC, Lot. 01207-01)入り、動物細胞の培養液の一種)

タンパク質の入った培地は発泡し易い。血清の入った培地はタンパク質が入っているので、発泡し易い培地の代表例として使用した。

- ③ 細胞培養液 (酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 使用: 約 1×10^8 cells/ml)

実際の細胞を含む培養液の例として、常温 (15~25°C) で培養でき機内でも安全に取り扱え、幅が3 μm以上ある酵母を使用した。

2. 3 実験条件

航空機実験では図1に示す涙滴型及び菱形の2種の細胞培養容器を使用した。これらの容器は2枚の透明な板の間に細胞培養液を満たす空間があり、多孔性の膜で2室に分割され、片側の室で細胞を培養する。以下では細胞を培養する室を「細胞室」、細胞培養液だけが入っている室を「溶液室」と呼んでいる。容器の両端には注入・採取するための出入口がある。航空機実験では、以下の条件にて気液界面を維持しながら膜を介して溶液を注入・採取するためのデータを取得した。

- ① 容器材質 : 天板 (観察面) ポリカーボネート
中板 (側胴部) シリコンゴム

- ② 容器容量 : 表1に示す。

- ③ 膜孔径 : 0.2, 3.0 μm

- ④ 膜材質 : ポリカーボネート

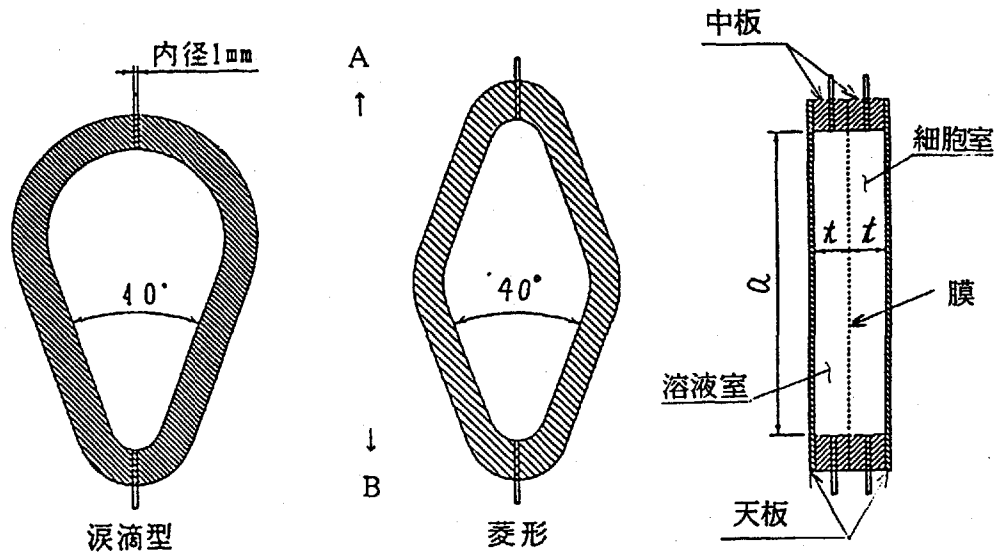
- ⑤ 注入・採取速度: 10~30ml/min

- ⑥ 出入口 : ・細胞室・溶液室に各1ヵ所
・細胞室に1ヵ所、溶液室に2ヵ所
・細胞室・溶液室に各2ヵ所

表1 培養容器容量
Table 1 Volume of Culture Chamber

容器形状	涙滴型	菱形
膜なし容器 (3mm×1室)	2.5ml	1.8ml
膜付き容器 (3mm×2室)	5.0ml	3.6ml

の3種類



a : (涙滴型) 46mm
 (菱形) 48mm
 t : 3 mm

注1) 斜線部の内側に液体を充填する。
 2) 突起は試料の出入口を示す。

図1 培養容器概念図

Fig.1 Conceptual Drawing of Cell Culture Chamber

2. 4 実験装置及び方法

(1) 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(図3では「容器」と表現)には試料溶液の入っているタンク、ポンプ及び廃液の入るタンクを接続した。培養容器は機内床面に対して試料出入口が垂直方向(図1でA方向が上、B方向が下)となるように設置した。試験内容に合わせて培養容器には事前に適当な位置まで試料溶液を入れておいた。試料溶液を注入する場合、実験支援システムから実験開始信号が出るとポンプを運転して試料溶液を培養容器下の出入口から注入した。培養容器上の出入口から押し出

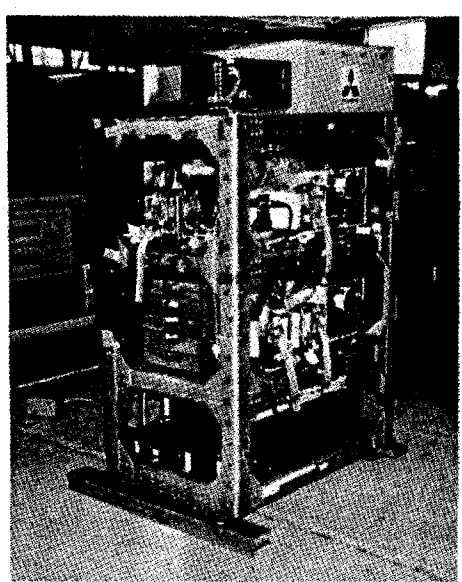


図2 実験装置写真

Fig.2 Outer view of the Experiment

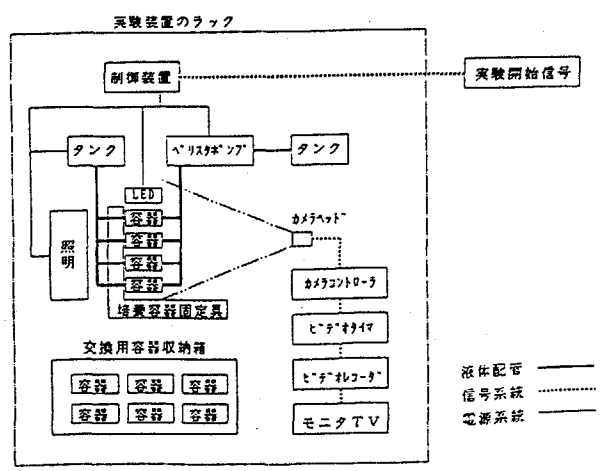


図3 実験装置系統図

Fig.3 Experiment Apparatus Block diagram

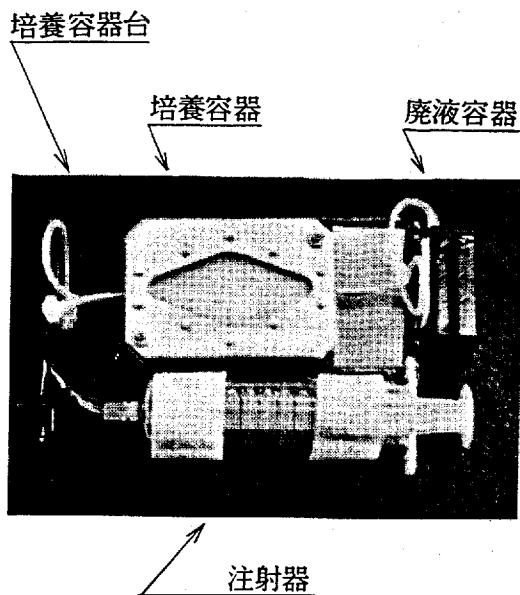


図4 手動操作器具
Fig.4 Manual Operation Apparatus



図5 手動試験状況
Fig.5 View of manual operation

された空気及び液体は配管を経て廃液用のタンクに入れた。試料溶液を採取する場合は、空気を培養容器に入れることにより、培養容器から試料溶液を押し出して採取した。培養容器に接続している配管とポンプに接続している配管にはマイクロカプラを取り付け、培養容器固定具を簡単に接続・分離できるようにした。4個の培養容器を1個の培養容器固定具に取り付け、これを4組用意した。1つの培養容器は2回の微小重力実験に使用し、2回毎に培養容器固定具単位で培養容器を交換した。培養容器後方には6W蛍光灯を1本設置し、透過光方式により試料溶液の挙動をビデオカメラで観察した。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した。

(2) 手動操作器具

微小重力中に搭乗員は図4に示す器具を手動操作した。この手動操作器具は以下のように構成されている。培養容器の一端に注射器を、他端に培養容器から溢れ出た試料溶液を溜める廃液容器を接続した。これらの器具は111×72mmの培養容器台に固定した。搭乗員はこの培養容器台を太股に固定して微小重力の間に注射器を操作し、溶液の挙動を観察した(図5)。

3. 実験結果

3. 1 涙滴型と菱形の比較

溶液を注入・採取時の気液界面形状は凸型や凹型となり、進行方向に対して左右対称とはならず傾いて移動した。そのため溶液及び空気の入出口を取り付けた部分の弧が大きい涙滴型の場合、図6に示すように注入時には気泡が残り易く、採取時には液滴が残り易かった。菱形では両端が細くなっているため涙滴型に比べて気液界面が安定であり、気泡あるいは液滴も残りにくかった(図7)。従って、気液界面を安定に維持しながら溶液を注入・採取するためには涙滴型より菱形が優れている。

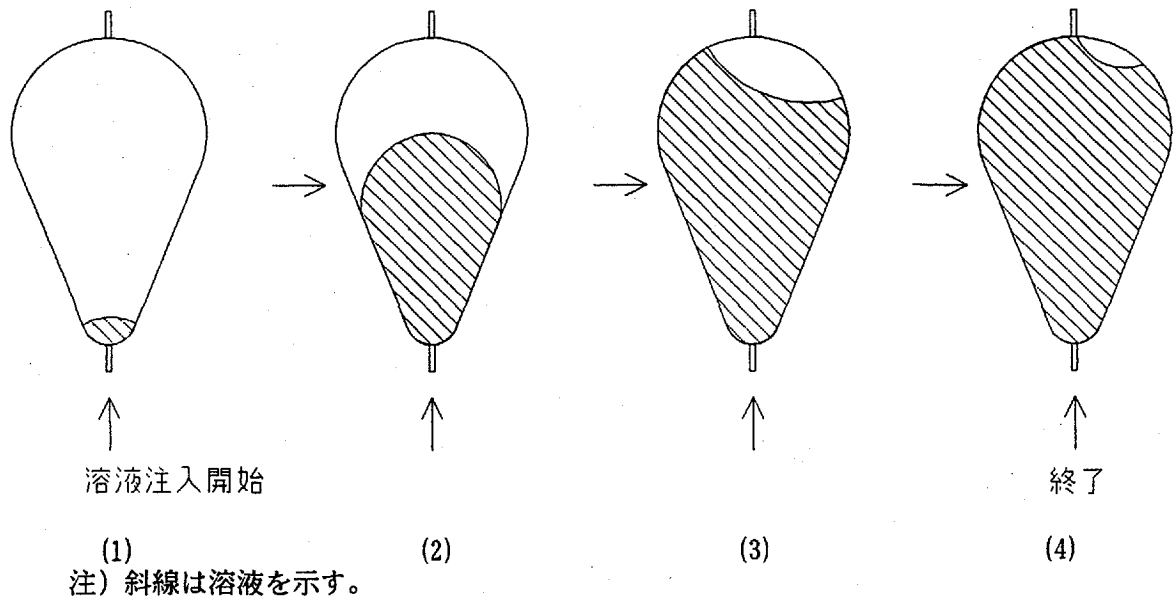


図6 涙滴型容器での溶液注入
Fig.6 Injection to a tear-drop type chamber

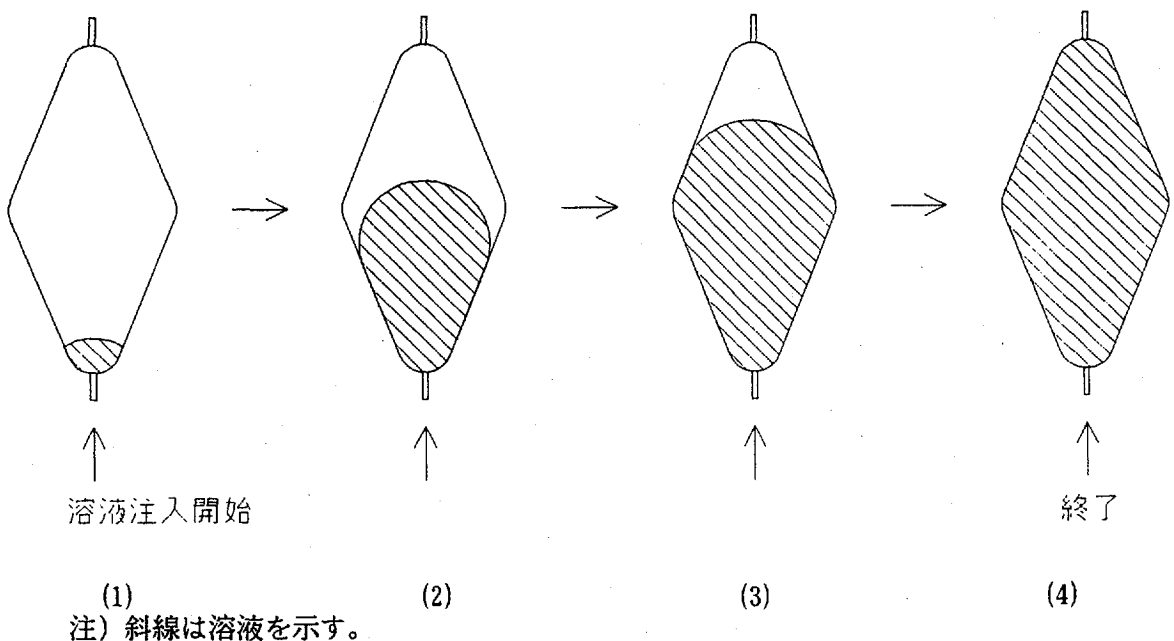
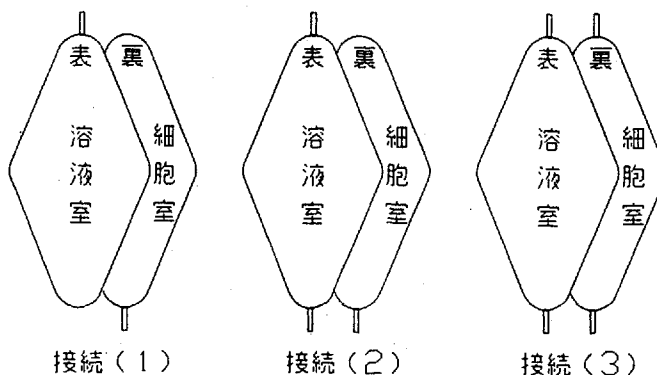


図7 菱形容器での溶液注入
Fig.7 Injection to a diamond type chamber

3. 2 注入方法

(1) 出入口各1ヵ所 (図8、接続(1))

細胞室が溶液で満たされると、溶液は膜から反対側の溶液室に不規則にしみ出すため (図9)、溶液室は気液混合状態となった。



注) ビデオカメラから見て膜の手前 (表) に溶液室、反対側 (裏) に細胞室を設置した。

(2) 出入口各2ヵ所 (図8、接続(3))

膜を介しての溶液の移動はないが細胞室・溶液室は気液界面を維持しながら溶液を注入できた。

(3) 出入口計3ヵ所 (図8、接続(2))

気液界面を維持しながら膜を介して溶液を注入することが可能であった。

ただし、孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜と孔径 $0.2\mu\text{m}$ の膜では膜を介した溶液の移動に差があり、以下のような結果となった。

孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜での注入操作では、細胞室から試料溶液を $15\text{ml}/\text{min}$ で注入し始め、5秒後に溶液室からも $15\text{ml}/\text{min}$ で注入し始めると、溶液は気液界面を維持しながら細胞室にだけ注入されて先ず細胞室を満たし、次いで溶液室でも気液界面を維持しながら注入され、最終的には容器全体が溶液で満たされ、気泡も残らなかった (図10)。

孔径 $0.2\mu\text{m}$ の膜では膜が若干膨らむまで細胞室にだけ溶液を注入すると、(1)と同様に5~10秒後に膜の反対側の溶液室に溶液がしみ出した (図9)。しかし、しみ出す前に溶液室に溶液を注

図8 培養容器出入口
Fig.8 Injection Port locations of cell culture chamber

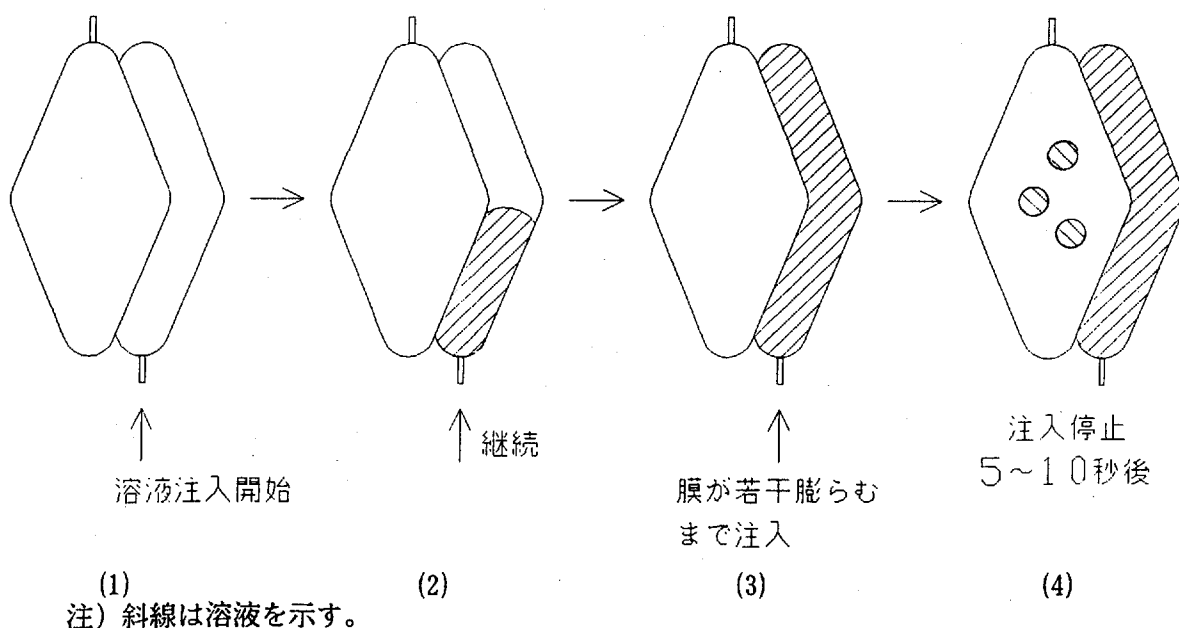
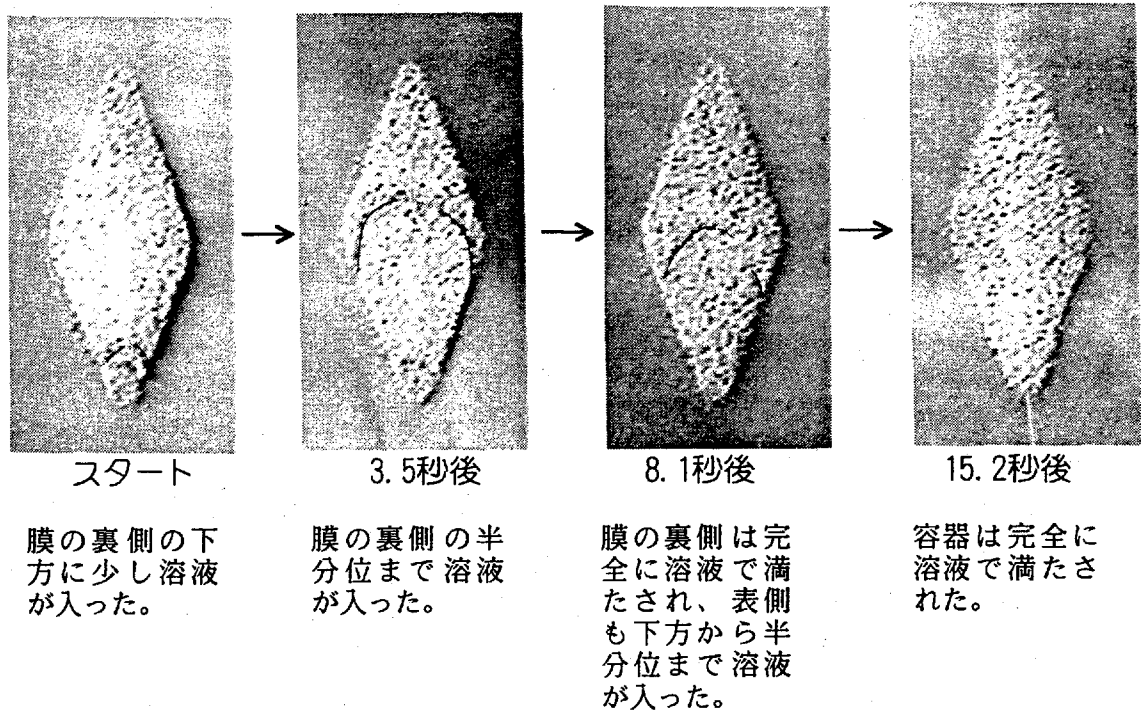


図9 出入口各1ヵ所の場合の溶液注入
Fig.9 Typical case of 1 injection port and 1 discharge port



注) 試料溶液を膜の裏側の下から入れ、手前側の上から抜いた。

図10 溶液注入 (孔径 $3.0\mu\text{m}$)
 Fig.10 Injection through the filter (pore size : $3.0\mu\text{m}$)

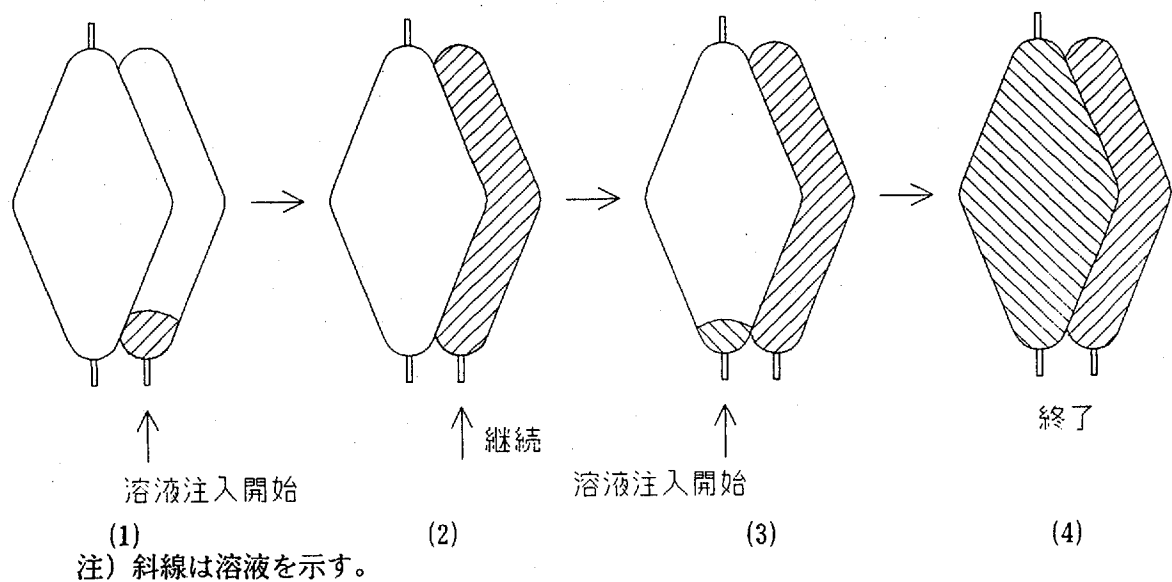


図11 溶液注入方法
 Fig.11 Suggested Injection method

入すると、細胞室と同様に気液界面を維持しながら溶液は注入され、最終的には容器全体が溶液で満たされ、気泡も残らなかった。

孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜では5秒の時間差を付けて注入操作を行ったが、実用上は細胞室が溶液で満たされるまで細胞室に溶液を注入し、次いで溶液室に注入することが望ましいだろう (図11)。

3. 3 採取方法

(1) 出入口各1ヵ所 (図8、接続(1))

細胞室が空になると、空気が膜から反対側の溶液室に不規則に移動し、溶液室は気液混合状態となった。

(2) 出入口各2ヵ所 (図8、接続(3))

注入時と同様、膜を介しての溶液の移動はないが細胞室と溶液室の溶液を気液界面を維持し採取することができた。

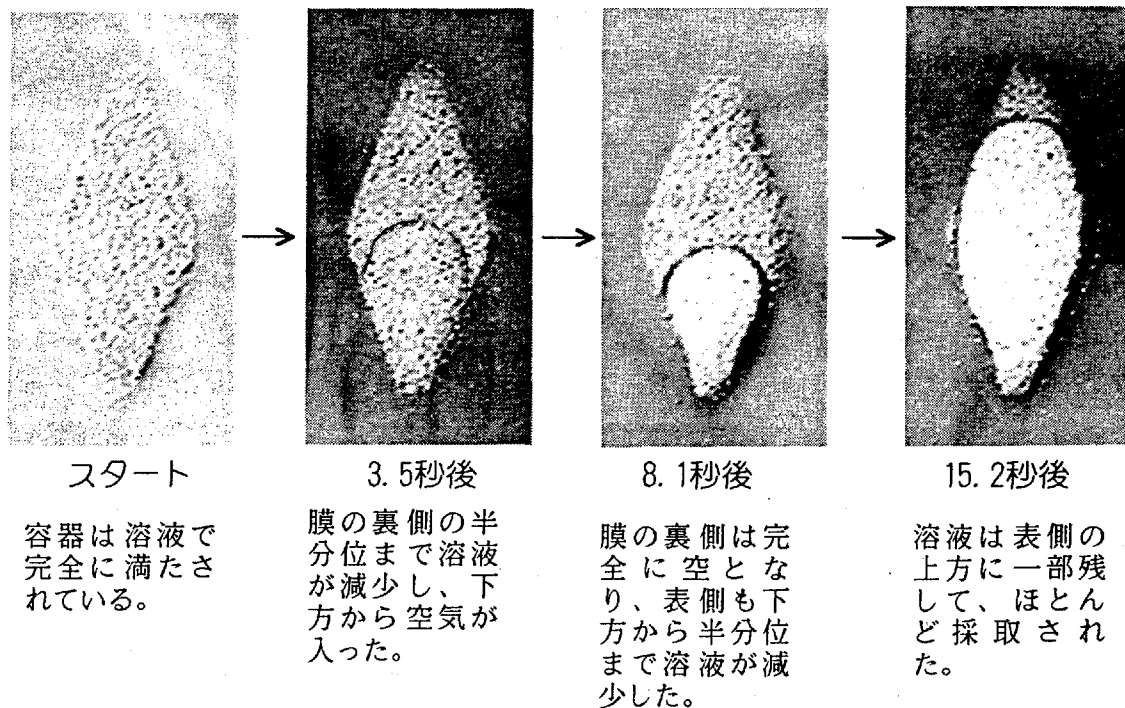
(3) 出入口計3ヵ所 (図8、接続(2))

気液界面を維持しながら膜を介して溶液を採取することが可能であった。

ただし、孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜と孔径 $0.2\mu\text{m}$ の膜では膜を介した空気の移動に差があり、以下のような結果となった。

孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜での採取操作では、細胞室から先に空気を $15\text{ml}/\text{min}$ で注入し始め、5秒後に溶液室からも $15\text{ml}/\text{min}$ で注入し始めると、溶液は気液界面を維持しながら細胞室から減っていき(採取されて)先ず細胞室だけが空になり、次いで溶液室でも気液界面を維持しながら減少し、最終的には容器が空となり液滴も残らなかった(図12)。

孔径 $0.2\mu\text{m}$ の膜では膜が若干膨らむまで細胞室に空気を注入して細胞室を空にすると、数秒してから膜の反対側の溶液室に空気が移動した。しかし、空気が移動する前に溶液室に空気を注入すると、細胞室と同様に気液界面を維持しながら溶液は採取され、最終的には容器は空になった。



注) 空気を膜の裏側の下から入れ、手前側の上から抜いた。

図12 溶液採取 (孔径 $3.0\mu\text{m}$)
Fig.12 Collection through the filter (pore size : $3.0\mu\text{m}$)

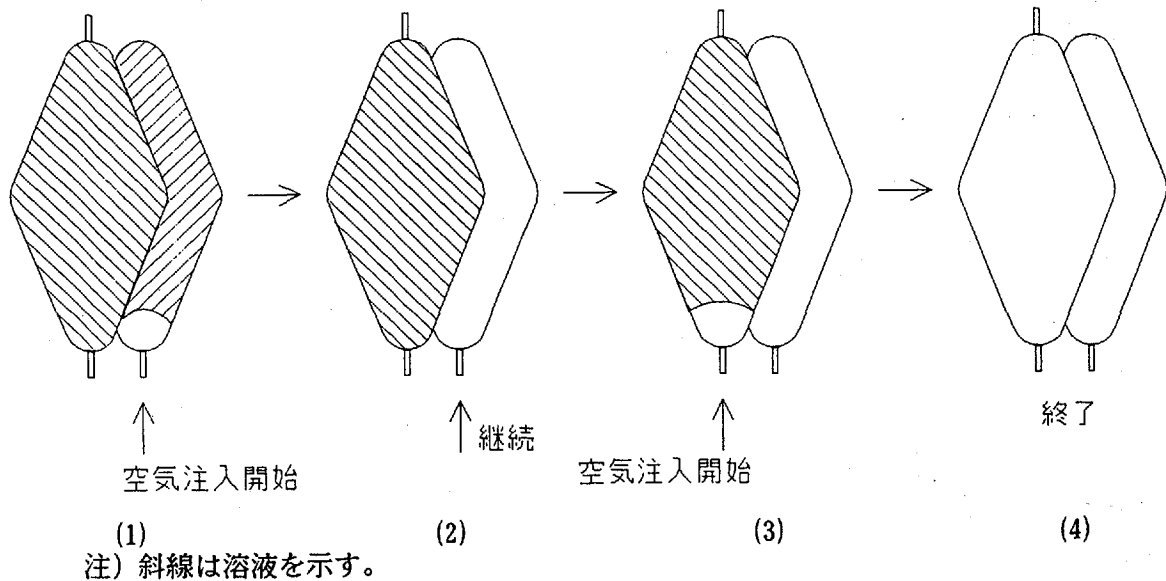


図13 空気注入による溶液採取方法
Fig.13 Collection method by air injection

孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜では5秒の時間差を付けて採取操作を行ったが、実用上は細胞室が空になるまで細胞室に空気を注入し、次いで溶液室に空気を注入する方法により溶液を採取することが望ましいだろう(図13)。

前回の航空機実験⁽³⁾で、試料溶液の採取では溶液を採取する方法と空気を注入する方法との間で気液界面の挙動に差がなかった。よって、図13の空気を注入する方法に代えて溶液を採取する方法でも気液界面を維持しながら液滴を残さず溶液を採取できると考えられる。

3.4 実験試料の影響

メチレンブルー水溶液、MEM培地及び細胞培養液の気液界面は同様の挙動を示し、差は殆どなかった。

MEM培地は空気を注入する方式により容器から採取すると発泡しやすかった。ただし、液がなくなるまで空気を注入すると、発生した泡は排出できた。

酵母を約 1×10^8 cells/ml含む細胞培養液では、地上での準備作業から空域到達後の試験開始までに酵母が炭酸ガスを発生したものの、気液界面の挙動は他の溶液との間で差がなく、膜による細胞(酵母)の分離も行われることを確認した。このとき、膜の破損もなかった。

3.5 注入・採取速度

孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜では $20\text{ml}/\text{min}$ 以下であれば気液界面を維持しながら溶液を注入・採取でき、膜を介しての溶液の移動も問題なかった。しかし、 $25\text{ml}/\text{min}$ 以上で溶液を注入すると気液界面が極端に突出して気泡が残るところがあった。

孔径 $0.2\mu\text{m}$ の膜では $15\text{ml}/\text{min}$ 以下であれば気液界面を維持しながら溶液を注入・採取でき、膜を介しての溶液の移動も問題なかった。しかし、 $20\text{ml}/\text{min}$ で溶液を注入すると、空気が膜孔を通過して反対側の室に移動する速度が溶液注入速度に追いつかず、膜が膨れた。この膜は操作終了後も伸びたまま元に戻らなかった。

3. 6 膜孔径

培養容器中央部の膜は細胞と培養液とを分離することを目的として設置している(図1)。孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜は動物細胞のように比較的大きな細胞を培養する場合に使用し、孔径 $0.2\mu\text{m}$ の膜は細菌のように小さな細胞を培養する場合に使用する。

孔径 $3.0\mu\text{m}$ の膜では流速 $20\text{ml}/\text{min}$ 以下であれば問題なく注入・採取できた。

孔径 $0.2\mu\text{m}$ の膜では、膜が若干膨らむまで細胞室に溶液を注入すると、5~10秒後によろやく膜の反対側の室に溶液がしみ出した。しみ出す前に強引に溶液を注入しようとしても膜の抵抗が大きき溶液は膜の反対側の室に移動せず、更に力を加えると膜が破れた。従って、孔径 $0.2\mu\text{m}$ では膜を介して溶液を移動する場合は、膜を破損しないよう十分注意して操作する必要がある。ただし、いったん溶液がしみ出すと $10\sim 15\text{ml}/\text{min}$ のゆっくりした速度で注入すれば膜が伸びることはなかった。

従って、注入・採取速度を $15\text{ml}/\text{min}$ とすれば、孔径 $3.0\mu\text{m}$ 、 $0.2\mu\text{m}$ の膜の両者が使用可能である。

3. 7 手動操作試験

図4の手動操作器具を用い、注入・採取速度 $15\text{ml}/\text{min}$ の操作が手動で可能かどうかの確認試験を行った。注射器の目盛りを見ながら4~5秒に 1ml ($12\sim 15\text{ml}/\text{min}$)の割合で注入・採取する操作を搭乗員にさせることで、搭乗員の個人差も含んだ操作の可能性が確認できた。今回の搭乗員は全員微小重力飛行初体験であり、この操作条件は地上での操作に比べるとかなり遅いので、慣れない微小重力状態での操作は精神的、肉体的動揺を引き起こすのではないかと心配していたが、飛行後の感想では全員いらいらしなかったとのことであった。微小重力中、体は不安定であったが、手動操作器具を太股に固定していたので操作はし易く、注射器のピストンを押したり引いたりする操作は苦にならなかったとのことであった。従って、図11.13の操作をJEMで実施する目処が付いたと考えている。

ただし、問題点もあった。地上での準備から試験まで約2時間あったのでピストンが固くなり、力を入れて動かそうとすると一気に 0.5ml 分位ピストンが動くことがあった。注入操作では容器内に溶液が噴水状に飛び出し、気液界面は乱れ気泡が多量に残った。そこで、地上での準備操作で気液界面を注射器と容器とをつなぐチューブ内にセットし、気液界面から容器入口まで約 1ml 分空けておいた。搭乗員は水平飛行の間に一度ピストンを動かして滑らかにし、気液界面を容器入口付近にセットしてから微小重力での操作を行った。

3. 8 溶液と容器材質

一般に細胞培養液は水溶液であり、濡れ性に関しては純水に近い性質を示す⁽³⁾。今回使用した培養容器の材質はポリカーボネートとシリコンゴムでありいずれも疎水性を示し、細胞培養液の気液界面を安定させるのに適した材料である。今後、細胞の種類により容器材質を変更する可能性も有るが、一般に樹脂は疎水性であるので容器材質として樹脂を使用する限り気液界面の安定性は今回と同様の傾向を示すと考えられる。

容器壁面に付着して生長する細胞を培養するとき、表面を親水性となるよう処理することが有る。この場合、気液界面の安定性は低下するが、円筒管では直径 7mm までであれば気液界面の安定

が確認されており⁽²⁾、現在検討している培養容器の厚さ3~7mmであれば親水性処理を施した容器でも今回と同様の操作を実施できるだろう。

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) 容器形状

気液界面を維持しながら溶液を注入・採取するためには、涙滴型より菱形が安定している。

(2) 培養容器の出入口

細胞室に1ヵ所、溶液室に2ヵ所の出入口を取り付ければ、気液界面を維持しながら膜を介して溶液を注入・採取できる。

(3) 注入・採取方法

注入操作では、15ml/minで細胞室から注入を開始し、この室を溶液で満たしてから反対側の溶液室にも溶液の注入を開始すれば、気泡を残さず容器を溶液で満たすことができる。

溶液の採取操作も同様の手順で行う。

(4) 手動操作

微小重力でも手動による15ml/minでの注入・採取が可能であることを確認した。

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
- (3) 渋川喜和夫、長岡俊治、宇佐美論、村上敬司、高沖宗夫、御所園利美、上村一秀、パラボリック フライト、Vol.3 No.2 (1993) pp.18-27