

培養下および移植下で利用可能な 3 次元細胞培養カプセルの開発

日大生産工 ○野呂 知加子

日大生産工 (院) 山下 翔平, 三浦 大輝, 佐野 由樹

1. 諸言

現在、再生医療のための研究開発においては、iPS 細胞や ES 細胞等の万能細胞および間葉系幹細胞等の体性幹細胞について、培養下での樹立と分化誘導の研究がさかんに進められている。前臨床研究からヒト疾患への臨床応用も始まっている。

再生医学前臨床研究では、幹細胞および培養下で分化誘導した細胞を実験動物に移植して、臓器再性能や分泌因子による再生誘導等の活性について研究している。しかし、培養細胞を直接生体に移植すると細胞が散逸する可能性があり、また培養下と生体内では条件が異なり定量性に問題を生じることが懸念されている。例えば骨髄や脂肪由来の間葉系幹細胞を体内に直接静注して、その再生誘導活性を臓器損傷治癒等に利用する報告があるが、この場合注入した細胞は多くが肺に捕捉され、そこから再生促進因子を分泌するとされている。この方法は、注入細胞のその後の挙動が明らかでなく、肺機能にとっても問題がある。

一方、通常幹細胞は数が少ないので培養で増幅する必要があるが、多くの場合平面的（2次元）な細胞培養皿を用いている。細胞は体内では立体的（3次元）な組織を構築しているので、幹細胞の形質を維持したまま増殖させ、生体と同じ条件で分化させるためには、3次元培養が必要である。

これらの課題を解決するために、3次元培養が可能で、しかも培養下および生体内で細

胞が散逸せず生存し、定量的定性的な比較検討が可能なデバイスが必要であり、そのための細胞培養カプセルを発明した。本研究はこの発明品を実用化することを目的とし、試作品の作成および細胞培養方法の検討を行った。

2. 設計

細胞培養液中(vitro)と生体内(vivo)の両方に用いることができる 3 次元細胞培養が可能な小型カプセルを考案した(Fig.1)。通常の組織内と同じ細胞の状態を作るために、外界と半透膜で仕切られた小さいカプセル様チャンバー内に細胞を 3 次元培養し、これを培養皿および移植体内の双方に適用するものである。カプセルを用いることで細胞が分散せず、増殖率および組織構築度などのデータ収集が可能である。細胞培養と生体移植を行き来し、同じプラットフォームで組織反応を比較する研究ができるので、再生医学や医薬品試験への技術展開が可能である。

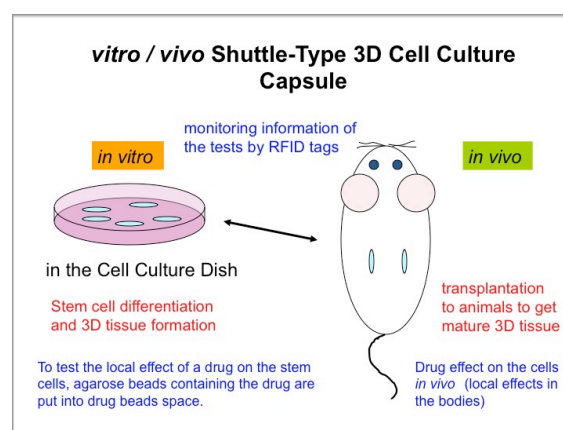


Fig. 1 シャトル型細胞培養カプセルの概念

vitro / vivo Shuttle-Type 3D Cell Culture Capsule

Chikako YOSIDA-NORO, Shohei YAMASHITA, Daiki MIURA and Yuki SANO

シリコン製（長さ 10-15mm、直径 4-5mm 長卵型）で大小 2 つの空所を持ち、大きい空所（細胞培養チャンバー）は 2 カ所外部に面した対面窓を持ち、その両面（および小さい空所との境界）にポリカーボネートメンブレン（ポアサイズ 0.1-12 μm ）が装着されている（Fig.2）。細胞培養チャンバー内にコラーゲンゲル等を装填し、細胞を播種して 3 次元培養を行う。小さい空所（ドラッグチャンバー）は大きい空所との境目にポリカーボネートメンブレンが装着されており、特定の試薬をしみこませたアガロースビーズを入れるなどして、試薬と細胞培養チャンバー内の細胞との相互作用を、培養下および生体内の双方で研究するのに用いる。2 つのチャンバーに物質や細胞を入れるための細い流路をそれぞれ 1 カ所ずつ持つ。本体側面には無線 IC タグが組み込まれており、実験動物の皮下に移植した場合でも、外部からそれぞれの実験内容情報がわかるようになっている。

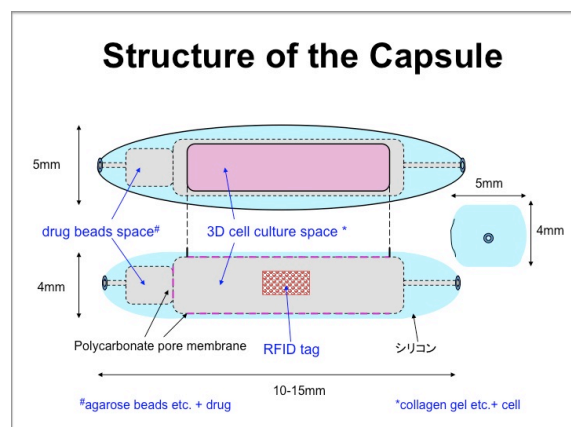


Fig. 2 細胞培養カプセルの構造

3. 試作品の作成と細胞培養実験

これまでにチャンバーの試作品を 3 種類作製し、材質・形状・境界浸透膜の材質等について検討を行った（Fig.3）。最初に作製したものは、形状は設計通りだったが、浸透膜とチャンバー材の接着性に問題があった。また、細胞定量解析時には膜の透明性が重要となるが、最初の試作品では接着性の関

係で色つきの膜を用いた。次にこの点を改善するために、チャンバーと膜の材質を工夫した。金型を 2 つ作ってシリコン素材を流し込み、後で両者を併せて結合する方法を工夫した結果、透明な膜で圧着はうまくいったが、形状が若干設計とは異なる形になり、生体に移植する際に問題がある。形状の改善のため、3D プリンターでモデルを作成した（Fig.3）。

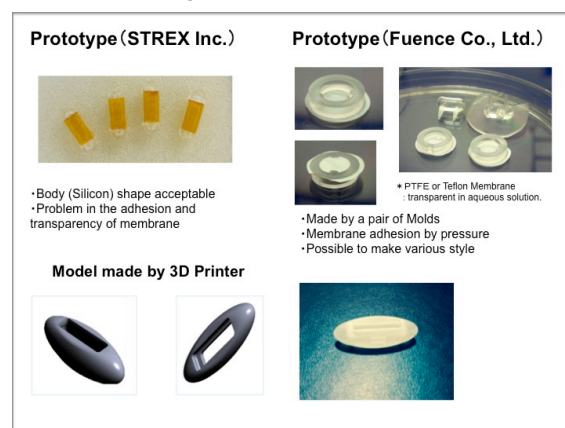


Fig. 3 細胞カプセルの試作品とモデル作成

一方、内部充填マトリックス素材については、細胞培養下でコラーゲンタイプ I,IV, マトリゲル等検討し、各種細胞の分化・組織形成に最適なものを選定した。

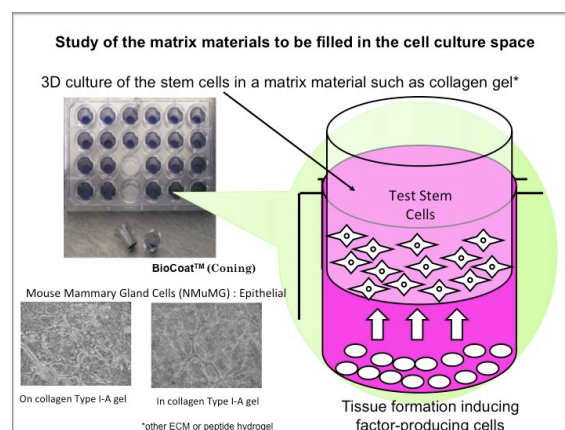


Fig. 4 内部充填マトリックスの検討

【参考文献】

- 1) Yoshida-Noro C *et al.*, (2015) *vitro / vivo Shuttle-Type 3D Cell Culture Chamber*. The Tissue Engineering Congress, London, 10 Sep. 2015
- 2) 野呂知加子 (2011, 2012-2013) JST 研究成果展開事業 研究成果最適展開支援プログラム (A-STEP) フィージビリティスタディステージ【F S】探索タイプ による