

11 生体薄膜の積層による再生組織構築のための灌流バイオリアクタの開発

山形大学工学部 技術部
情報技術室 橋本 通宏

1. 研究背景・目的

再生医療とは疾患により臓器の一部が欠損、及び機能障害となったとき、培養した細胞組織を患部に移植し、その機能を再生させる医療法である。幹細胞に基づく再生医療において、まず幹細胞を再生させたい組織・臓器の細胞に分化させ、体外に再生組織を一旦構築した後に移植する方法が最も効果的であると考えられる。従来の研究では、組織を構築する際に毛細血管の欠如が問題になり、栄養物質の有効な拡散限度以上（ $100\mu\text{m}$ ）の三次元再生組織を作ることが出来ない。

そこでこの問題を解決するために、本研究では培養基質積層法による三次元再生組織の構築のための灌流培養装置を開発する。

2. 研究内容

現在行っている研究では目標とする再生組織は心筋再生組織とし、培養基質には豚の羊膜を用いている。

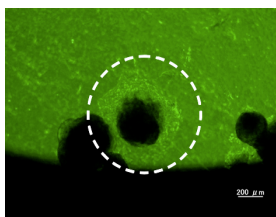


写真1. 胚性幹細胞 (ES細胞)



写真2. 豚の羊膜

使用されている培養法は一枚の羊膜の上にES細胞を播種し、定期的に培養液の交換を行って目的の心筋細胞に分化誘導させる方法である。しかしながら、この手法では培養液が層と層の間に送れず、三次元再生組織を構築することが難しいので、これらの問題を解決する装置をどのようにして設計するか検討する。

開発方針として、まず装置に必要となる主要パーツの設計を行う。次にこれらを組み合わせて製作した装置を用いて、実際に組織の培養実験を行い、最適な培養条件（灌流流量、循環方式など）を確立する。方法として、製作した装置を用いて多重に積層したES細胞より分化した心筋細胞-羊膜組織を培養し、培養実験結果に基づき更に装置の改良を行う。最終的に多重層構造内部の細胞代謝を良好に維持できる装置を完成させる。

3. 研究方法・装置製作

図1に示すように、重ねられた培養基質の層と層の間に専用のポンプを用いて培養液を流しこみ、循環させることによって、三次元再生組織内部においても最適な培養環境を作り上げることが可能である。また、この培養液の循環は再生組織内の血管新生を促進させる役割を担っており、生体内に適しやすい再生組織を構築させることが出来ると考えられる。

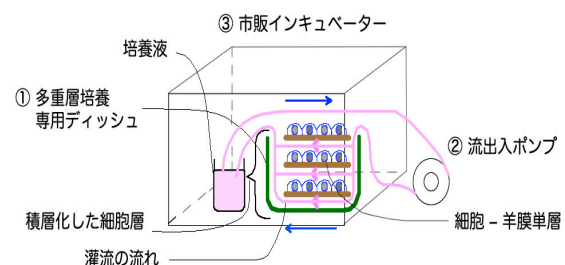


図1. 灌流バイオリアクタの概念図

この培養液循環システム、そして装置本体を本研究では灌流バイオリアクタと名称付けた。

灌流バイオリアクタを作り上げるために主要となるパーツを作成する。パーツは培養液循環用ポンプ、インキュベーターポンプ間固定器具、ポンプチューブーディッシュ間固定器具、及び多重層培養基質専用ディッシュである。

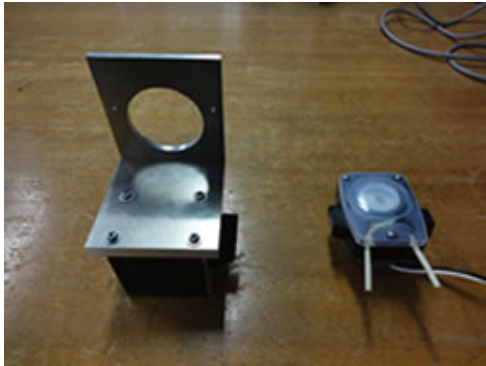


写真3. 主要パーツの一部
(専用ポンプ固定器具、専用ポンプ)

主要パーツを作成後、すべてのパーツを組み合わせて灌流バイオリアクタを製作する。製作した装置をインキュベーターに取り付ける。



写真4. インキュベーターへの装置取り付け

4. 装置内培養液循環実験

製作した装置の多重層基質培養専用ディッシュ上に羊膜のみを二重に重ねて、その間を培養液が流れているかどうか検証した。流れ確認のため、培養液に赤血球を追加し、二重層の羊膜間で赤血球が流れる様子を確認した。

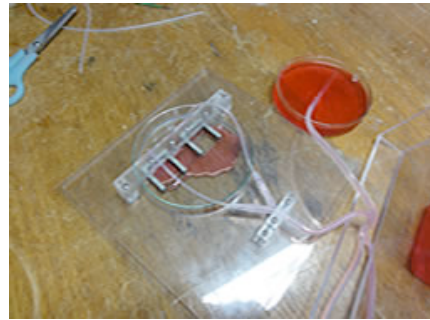


写真5. 培養液が専用ディッシュへ流入する様子

今回の実験では厚さ 1.3mm のカミソリ刃を 2mm 間隔で 10 枚重ねて、これを二重層羊膜上に圧着させて、羊膜全体に十分に培養液を行き渡らせる流路の役割を担うよう設計した。

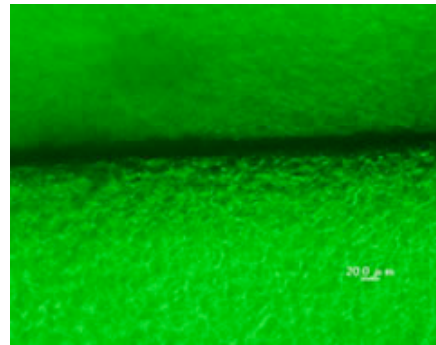


写真6. 多重層羊膜内の様子
(黒部分はカミソリ刃)

実験の結果として羊膜の層と層の間で赤血球の流れが確認できた。しかしながらカミソリ刃間の場所によっては培養液の流入量に差が見られた。またカミソリ刃では羊膜を傷つけてしまい、破れる恐れもあることから細胞を傷つけない素材で、より流路の間隔を狭くし、有効拡散限度に近づく設計をする必要があることが分かった。

5. 今後の方針

今後の大きな課題となるのが、多重層培養専用ディッシュ上への再生組織構築方法の検討と、組織内に万遍なく栄養素を行き渡らせるための培養液流路設計の2点である。微細な加工技術を活かした流路設計を今後は行っていきたいと考えている。