

化学物質検出用多チャンネル灌流培養装置の開発

近江谷 克裕 [北海道大学大学院医学研究科/教授]
扇谷 悟 [産業技術総合研究所ゲノムファクトリー研究部門/研究員]
渡辺 俊之 [アトー株式会社/研究員]

背景・目的

化学物質の毒性を効率よく評価する技術開発は重要な今日的課題である。我々は既に環境ホルモン等の有毒な化学物質を検知可能な発光細胞を、さらには、本評価発光細胞の汎用化を目標に、本細胞群を灌流培養しつつ、各種化学物質群を自由に導入、毒性を発光の変化で評価できる多チャンネル灌流培養装置の開発を進めている。そこで本研究では、灌流培養装置で最も重要な、細胞をマイルドな状態で維持しつつ、化学物質等を自由自在に加え、化学物質群の細胞に与える影響を評価できる専用培養チャンバーの作製を目標とする。

内容・方法

細胞内の化学物質等の影響を発光で評価する化学物質評価用培養チャンバーとして、細胞をマイルドな状態で維持しつつ、化学物質等を自由自在に加え、細胞が発する光を計測、各種薬剤を投与できる仕様の専用培養チャンバーの開発を目指す。本研究では、東京に本社を置くアトー株式会社と共同して行う。研究開発のポイントは、培養、流路、及びコンパクト化である。具体的な研究項目は、1) 培養容器の細胞培養条件の検討、2) 培養容器への流路系の設計、3) 専用培養チャンバーの試作、4) チャンバー検証のための化学物質評価発光細胞の構築、である。全体の研究の流れは、北大の近江谷が中心に培養容器と流路系を設計、アトー社の渡辺の技術協力を得て試作を行い、北大の近江谷が最適化を計る。より、具体的には、培養条件としては、培養容器内の培地は20-30分程度で入れ替わるが、細胞自体のダメージの無い条件(細胞の生活性を指標)とし、培養槽の器材の選択・処理法、流路器材の選択、流路の導入位置等を検討する。

結果・成果

化学物質評価用培養チャンバーは再現性よくワンタッチで12穴プレート設置が可能とし、12穴マルチプレートの内の半分に当たる6穴部分に対応し、6検体を同時灌流しつつ、試薬等が挿入可能な仕様とした(図1)。特に、種々の市販の12穴プレートを用い、多くのプレートが脱着可能なものとして汎用性を高めることにした。また、各穴にはそれぞれ培養液を灌流可能なチューブを装着したシリコン栓でふたをするような形とし、操作が容易なものとした。多くの培養細胞が6チャンネルポンプ

流量として-8.0ml/hour以下で負荷に耐えられることを試験的に確認、この範囲以上の負荷が加わらないようプレート内の液量を調整するため、ノズル先端とディッシュ底面間の距離が常に一定になるように配置した。試行錯誤を行った結果、培養液を吸引する側のノズルは、ディッシュの底から1mmの距離に位置が最適であることが判明、ここに設定した。本チャンバーは灌流培養装置内の恒温槽に設置可能とし、温度、CO₂濃度、湿度の制御がスムーズに行われるようにした。ポンプを連続的に動かし続ける動作に加え、一定時間ごとにポンプを動かしサンプルを回収、断続的な灌流培養が可能なチューブとして種々の材料を検討、ピーク材、シリコンチューブや径も検討し最終決定した。これらの点を踏まえ構築した化学物質評価チャンバーを試作、初期段階として試作品の作動は培養液等でスムーズに灌流が行えることで、その性能を確認した。

一方、化学物質評価用培養チャンバーの性能を検証する発光細胞についても構築した。作製した細胞は発光マウス由来の初代培養細胞であり、24時間周期で変動する時計遺伝子をモニターする細胞である。本発光細胞を36時間まで培養、化学物質を入れた細胞群(緑、紫色線)は、入れない細胞群(赤、青色線)に比べて、発光量が増加することが確認できた(図2)。この結果、本細胞群が化学物質の毒性等を評価できることが明らかになった。今後、今回作製した化学物質評価用培養チャンバーにより、化学物質評価発光細胞を灌流培養しつつ、化学物質の評価を進める予定である。



図1 化学物質評価用培養チャンバーの外観

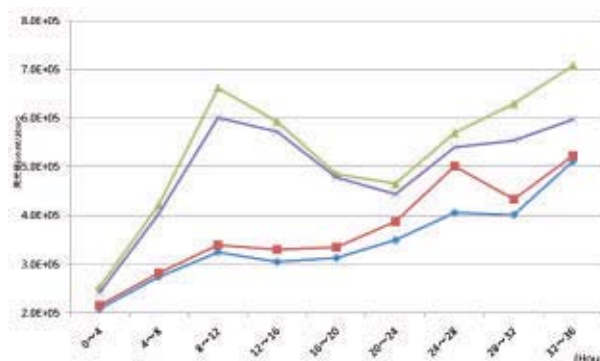


図2 化学物質評価用発光細胞の発光量の変動

今後の展望

化学物質を検出、光で知らせる細胞をターゲットに、より *in vivo* に近い *ex vivo* を作り出すことは、細胞内の機能を利用した実験動物代替法として極めて有用な方法である。灌流培養法の確立が極めて重要なのは、細胞をより生理的な条件下で維持しつつ、化学物質等の影響を評価できる点にある。今後、化学物質評価用培養チャンバーの有効性を多くの評価発光細胞で検証、データを蓄積することで、実用化の道を探る予定である。最終的には、共同研究先であるアトー株式会社と交渉、製品化を進める予定である。事業展開として、始めに、化学物質評価分野へ、続いて、同様に細胞応答を指標とする創薬分野等への対応を計画している。