平板型高細胞密度バイオリアクターの流動特性と酸素代謝の評価*

白 樫 了^{*1}, 高 野 清^{*1}, Christophe PROVIN^{*2}
酒 井 康 行^{*2}, 藤 井 輝 夫^{*1}Measurement of Flow Characteristics and Oxygen Metabolism of Plate
Type Bioreactor for *in vitro* High-Density Cell CultureRyo SHIRAKASHI^{*3}, Kiyoshi TAKANO, Christophe PROVIN,
Yasuyuki SAKAI and Teruo FUJII^{*3} Institute of Industrial Science, The University of Tokyo,
4-6-1 Komaba, Meguro-ku, Tokyo, 153-8505 Japan

Engineered tissue of digestive organ requires high cell density around $10^7 \sim 10^9$ cells/mL. For the production of such a high cell density engineered tissue, namely a bioreactor, microstructured scaffold and the flow system supplying oxygen to the cells, should be designed systematically. For this purpose, the plate type hepatic bioreactor, which was optimally designed to support 10^8 cells/mL cells, was produced to estimate the flow characteristics and oxygen metabolism. The microstructured scaffold which is composed of aligned square pillars, was designed to allow hepatocytes to attached on the surface of microstructures in cell density of 10^8 cells/mL. The designed scaffold with microstructures (pillar height: 109.6 μm , channel: 33.1 μm) was fabricated using PDMS. The flow resistance of fabricated scaffold was measured at flow rate from 0.46 to 2.0 mL/sec. Thereafter, hepatoma cell line HepG 2 were cultured in the scaffold with open culture to compose bioreactor of high cell density around $9.7 \times 10^7 \sim 1.9 \times 10^8$ cells/mL. Finally, the bioreactor was closed for perfusion cell-culture, which simulates *in vivo* circulation system. Oxygen concentration of inlet and outlet of the bioreactor in perfusion cell-culture were measured under the perfusion flow rate from 0.3 to 2.2 mL/min. The result showed that there is a certain flow rate, under which the bioreactor consumes maximum oxygen. Nevertheless maximum cellular oxygen metabolic rate in the bioreactor is far lower than normal cellular metabolic rate. This trend explains the diffusion resistance on cellular surface and the detachment of cells from the surface of bioreactor at high flow rate.

Key Words: Biological Components and Systems, Mass Transfer, Bio-Fluid Mechanics, High Density Culture, Oxygen Metabolism, Microfluidics

1. 結 言

生体組織工学では、生体適合性や融合性のある人工物と細胞を体外で組み合わせて、移植可能なハイブリッド組織・臓器を製作する治療を目的としている。このような治療法は、組織カセット工学、Tissue Engineeringとよばれ、わが国でも文献(1)でその需要や臓器ごとの調査報告がなされており、生体間の移植と異なり、需給のバランスが緩和される点や、自己細胞を用いることにより、免疫反応の影響がほとんどない組織や臓器を用いることができる点で優れている。このような人工臓器・組織は、組織・臓器内の細胞の大半を占める付着性細胞を保持する為、人工物の足場(scaffold)を用いるので、その材料物性や足場の形状を適切に設計する必要がある。即ち、物性については、足場材料がもつ生体適合性・生分解性等の化学的性質、移植後の生体内で予測される力学場に適応できる

機械的強度、対象となる細胞や生体内の他の細胞との付着性等の界面の性質、等を適切に選択・設計する必要がある。また、細胞の生化学的代謝機能が重要な消化器系の臓器・組織では、通常培養の100~1000倍の培養密度にあたる $10^8 \sim 10^9$ cells/mLで細胞を保持する必要がある。これら、足場の材料物性や形状の設計に加えて、細胞外で上記の高細胞密度を培養する培養方法の問題も存在する。細胞の生存を維持するエネルギー代謝では、酸素とグルコースは不可欠であり、特に酸素については、体内では赤血球内のヘモグロビンにより2~7mMの酸素を保持できる血液により供給されている。一方、培養の場合、空気飽和した37℃の培養液は214 μM であり、酸素担体を用いずに細胞への酸素供給を十分に行うためには、培養液の供給流量を増やさざるを得ない。

従来の研究として、足場材料や加工に関する研究⁽²⁾の他に、高細胞密度の実現に焦点を充てて、生体融合性のあるポリ乳酸やコラーゲンなどを無秩序構造の

* 原稿受付 2008年8月22日。

^{*1} 正員、東京大学生産技術研究所(〒153-8505 東京都目黒区駒場4-6-1)。^{*2} 東京大学生産技術研究所。

E-mail: aa21150@iis.u-tokyo.ac.jp

多孔質体に成形した足場⁽⁴⁾、材料を微細加工することで秩序構造をもつ足場⁽⁵⁾を作製し高表面積/体積比を期待した研究がなされている。しかしながら、いずれの場合も、代謝を維持した高細胞密度は実現されていない。その原因として、環流培養における環流の流速が高いために壁面近傍流れによる剪断応力により細胞が足場から剥離・流出していたり、形状の微細化が不十分で必要な表面積/体積比が維持されていなかったり、酸素供給が不十分で細胞が不活性化あるいは死滅していることが考えられている。本研究で対象とした肝組織についても、レビュー文献(6)で述べられているように細胞への酸素輸送が一つの大きな問題となっているものの、必ずしも原因についての系統的な調査がなされていないことが、高密度培養の設計法の確立を妨げている。

以上の現状を踏まえて、本研究では、必要な細胞密度より足場の表面積/体積比を定量的に把握することで、その微細構造を設計して、 10^6 cells/mL の高細胞密度を実現することを試みた。さらに作製した足場の流動抵抗や、酸素供給量に対する細胞群の酸素代謝を測定することで、設計・作製した足場の流動特性やエネルギー代謝機能の評価した。即ち、角柱を正方配列させた足場構造を有する平板型バイオリアクターを作製し、細胞密度 10^6 cells/mL が付着可能な最適形状を計算した。バイオリアクターの足場の作製の生体適合性材料であるPDMS (Polydimethylsiloxane)を用い、細胞が付着しない状態で流動抵抗を測定した。さらに環流培養条件下で、培養液流量を変化させて酸素代謝率の定常測定を行った。以下、微細構造をもつ足場に細胞が付着し密閉したものをバイオリアクターと称することにする。

主な記号

A_{cell} : HepG2一細胞当たりの付着面積 [$\phi 23\mu\text{m}$ の等価直径円に相当, $4.15 \times 10^{-10} \text{ m}^2$]
 a : ピラー辺長 [m]
 b : ピラー間距離の半分 ($2b$ =流路巾) [m]
 D : 培養液中の酸素拡散係数 [$\sim 10^{-9} \text{ m}^2/\text{sec}$]
 h : ピラー高さ [m]
 M_R : バイオリアクターの酸素代謝率 [mol/sec]
 n : 細胞密度 [cells/mL]
 Q_m : 質量流量 [kg/sec]
 Q_v : 体積流量 [m^3/sec]
 R : 流動抵抗 [$\text{Pa sec}/\text{m}^3$]
 Sh : シャーウッド数
 α : 細胞付着平板面の数 (1: 底面のみ, 2: 密閉す

るガラス平板と底面)

α_p : 細胞(ピラー)表面の物質伝達率 [m/sec]

ΔC_{O_2} : バイオリアクター出入口酸素濃度差 [mol/ m^3 またはM]

ΔP : 圧力差 [Pa]

ρ : 培養液密度 [$1.0 \times 10^3 \text{ kg}/\text{m}^3$]

Subscript

opt : 最適値, 目標値

2. 実験および解析方法

本研究で使用したバイオリアクターの足場は、シリコンウェハーをエッチングして作製した微細構造の型に、PDMS(Polydimethylsiloxane)を注入して成形した。また、この材料は生体適合性はあるが、細胞接着性が低い為、表面処理⁽⁸⁾を施した後、 3.0 mg/mL コラーゲン溶液(Cellmatrix Type I-P, 新田ゼラチン)を 1 mM HCl で 10 倍希釈した 0.3% コラーゲン酸溶液でコーティングして細胞が接着できるように表面改質をした。

2-1 足場内の微細構造の設計

細胞が付着する足場内の微細構造は、図1に示す様な角柱型ピラーが林立した構造をもち、既報⁽⁹⁾の最適化計算手法で寸法を最適化した。即ち、微細構造の単位体積当たりの表面積を計算し、予め実験的に測定した1細胞の付着面積で除することで、以下の式で示す単位体積当たりの細胞数(細胞密度)を求めた。

$$n = \frac{\alpha \{ (a + 2b)^2 - a^2 \} + 4ah}{h(a + 2b)^2 A_{cell}} \quad (1)$$

ここで、 α は細胞が接着する足場の平板面の数を示しており、1の場合は底面のみ、2の場合は足場平板の底面・上面共に接着する場合を示している。微細構造の各寸法の最適化は、通常は式(1)が極大となる a, b, h を計算して、その極大値に目標とする細胞密度を代入することで求める。しかし、 n は h, b については、単調に変化する関数なので、 a に関する微分が0になる極大値の場合のみを考慮した。従って、最適な a とその時の n は、以下の式で記述できる。

$$a_{opt} = \frac{2bh}{h + \alpha b}, n_{opt} = \frac{(h + \alpha b)^2}{A_{cell}hb(2h + \alpha b)} \quad (2-1, 2-2)$$

結局、最適化したピラーの高さ、 h_{opt} と一辺の長さ、 a_{opt} は、目的とする細胞密度、 n_{opt} と流路巾、 $2b$ を決めると以下の様に記述できる。

$$h_{opt} = \frac{\alpha b \{ 2 - A_{cell}bn_{opt} + \sqrt{bA_{cell}n_{opt}(4 + A_{cell}bn_{opt})} \}}{2(2A_{cell}bn_{opt} - 1)} \quad (3)$$

Fig.1 Schematic diagram of microstructured scaffold and the unit structure of microstructure

$$a_{opt} = \frac{4\sqrt{b} - 2A_{cell}b^{3/2}n_{opt} + 2b\sqrt{A_{cell}n_{opt}(4 + A_{cell}bn_{opt})}}{3A_{cell}\sqrt{bn_{opt}} + \sqrt{A_{cell}n_{opt}(4 + A_{cell}bn_{opt})}} \quad (4)$$

細胞の付着面積は、予め通常の25cm²のポリスチレン製フラスコにコンフルエントで付着した細胞の全付着面積を計測した細胞数で除して算出したところ、415μm²(等価直径 ϕ 23μm)であった。最適な微細構造の寸法は、PDMSの加工可能範囲、1細胞の付着に必要な長さ(>23μm)を拘束条件として決定した。尚、製作した足場は、 a, b については上面からの顕微鏡写真(IX-50, Olympus)から、 h についてはレーザー変位計(LT-8110, KEYENCE)で測定して作製したサンプルの寸法を確認した。

2.2 流動抵抗の測定

図2に最適設計された微細構造をもつPDMS製バイオリアクター全体の流動抵抗を測定する実験系を示した。測定は酸素代謝測定に供する足場をガラス板で密閉して、細胞が接着していない状態でおこなった。一定流量の超純水をケミカルポンプ(Mini Chemi Pump NP-KX-110, 日本精密科学)でバイオリアクター内に送り込み、入口のゲージ圧力、 ΔP 、を圧力センサー(PGM-2KC, 共和電業)で測定した。体積流量、 Q_v は、一定時間内に大気圧下に流出した超純水の質量を精密天秤で測定し、測定した時間で除することで算出した。測定は、同一流量について最低各3回以上おこなった。流動抵抗、 R は、測定した諸量と以下の式より算出した。

$$R = \Delta P / (Q_v / \rho) = \Delta P / Q_v \quad (5)$$

2.3 足場内の細胞培養と細胞数の測定

製作したPDMSの足場内にヒト肝実細胞株 HepG2 を播種し、細胞を微細構造内に高密度培養した。十分な量の酸素を供給するために、足場はガラス板で密閉せず、足場を薄く覆う程度の培養液 (DMEM(Dulbecco's

Fig.2 Measuring system for flow resistance of scaffold

Fig.3 Measuring system for oxygen consumption rate of bioreactor

Modified Eagle Medium; Low Glucose 1X, GIBCO)+10%(v/v)ウシ胎児血清(FBS,BIOLOGICAL INDUSTRIES)+0.5%(v/v)抗生物質(ANTIBIOTIC ANTIMYCOTIC SOLUTION (100X) STABILIZED,SIGMA))に浸して、コンフルエントに至るまで緩やかに加振しつつ数日間培養した。

顕微鏡観察より、細胞がコンフルエントに達したことを確認した後、培養液内のグルコース濃度を1時間毎にグルコース濃度計(GT-1661, アークレイ)にて測定し、既報で測定したHepG2一細胞当たりのグルコース消費率⁽¹⁰⁾(1.73×10^{-16} mol/sec/cell)で除することで付着した全細胞数を測定した。尚、測定は、グルコース消費率に影響を与えない、グルコース濃度が十分に高い範囲で行った。

さらに2.4の酸素代謝率測定後に、足場に残留した細胞をトリプシンEDTA(Gibco)で剥離し、粒子計数分析装置(CDA-500, Sysmex)で測定した。測定値は、各サ

Fig.4 Optimized microstructure, h and a to channel width $2b$

Fig.5 Flow resistance of scaffold at various volume flow rate

a) 1 day after inoculation

b) 7 days after inoculation

c) 7 days; confluent

Fig.6 Microphotographs of HepG2 cells cultured in optimized scaffold (a), b) from the top of scaffold, c) a pillar cut out; side view. White arrows indicate a pillar, and a black arrow indicates adherent HepG2 cell)

ンプルにつき直径 $5\mu\text{m}\sim 20\mu\text{m}$ に分布する細胞数を3回測定して平均した値とした。

2.4 バイオリアクターの酸素代謝率の測定

2.3で微細構造をもつ足場にHepG2が高密度培養されたサンプルを、ガラス板で密閉することでバイオリアクターを構成した後、定常状態(約1時間後)の酸素代謝率を種々の流量で測定した。測定は図3に示すような、環流培養系を用いた。バイオリアクターを通過して流出する培養液の酸素濃度を、精度を補償するために一定温度に保った溶存酸素濃度計(Oxygen meter 782, Strathkelvein Instrument)で測定し、流入する空気飽和の酸素濃度から引いた値に流量を乗じた式(6)より、バイオリアクター内の酸素代謝率を求めた。

$$M_R = \Delta C_{O_2} Q_v \quad (6)$$

37℃に温度調節した環流培養系を流れる培養液に加湿した5%CO₂-空気を曝して生成したpH7.0~7.2、温度37~40℃の空気飽和培養液(酸素濃度=214μM)を、バッファー(図3 Buffer Medium)に貯めて、バイオリアクターに流入する培養液の温度や溶存酸素、pHが一定になるように管理した。培養液は、このバッファーからケミカルポンプで調節した流量でバイオリアクター内へと送られる。溶存酸素濃度計は流量に敏感なので、流

量をかえるたびに測定に先だって、三方活栓を切り替えることで、空気飽和培養液を図3に示すバイパスを通して直接濃度計に流して校正した。この校正に必要な約1分間は、バッファー内の空気飽和培養液を、ペリスタポンプでバイオリアクターに送り込むことでバイオリアクターの細胞の酸欠を防止した。測定した流量は0.2mL/min~2mL/minで、細胞が足場から剥離しないように低流量から開始した。

3. 結果

3.1 足場内の微細形状の最適化 図4に密閉するガラス板へ細胞を付着させない場合($\alpha=1$)に細胞密度 $n_{opt}=1.0 \times 10^8 \text{ cells/mL}$ が達成できる微細構造の形状を、ピラー間の流路巾 $2b$ の関数として示した。流路巾とピラーの高さ・辺長は、細胞の付着面積をもつ等価円直径($\sim \phi 23\mu\text{m}$)より長く取る必要がある。流路巾を広くするにつれて、最適なピラーの高さは急激に低くなり、最適なピラー辺長は緩やかに長くなる。即ち、流路巾が広がると、ピラーは扁平になる。加工上の制約から、本研究では、流路巾 $2b=31\mu\text{m}$ 、ピラー辺長 $a=23\mu\text{m}$ 、ピラー高さ $h=83\mu\text{m}$ を目標に作製した。出来上がった足場全てについて、これらの寸法を測定した結果、平均して $a=26.7(\text{S.E.} \pm 0.5)\mu\text{m}$ 、 $2b=33.1(\text{S.E.} \pm 5.0)\mu\text{m}$ 、

Table 1 Measured cell density and cell population in the bioreactors (S.E. 12.3%)

Sample No.	Initial Cell Population (million cells)	Initial Cell Density ($\times 10^8$ cells/cm ³)	Cell population after the measurement (million cells)
1	8.11	1.06	4.53
2	13.4	1.74	9.22
3	12.5	1.63	5.85
4	16.2	2.11	7.53
5	14	1.83	8.69
6	12.3	1.61	4.04
7	11.5	1.5	4.63
8	16.3	2.13	12.4

Fig.8 Oxygen metabolic rate in bioreactors

$h=109.6$ (S.E. ± 10.7) μm となった. この値を持つ足場は, 計算上は細胞密度 8.95×10^7 cells/mL を支持できる.

3.2 足場の流動抵抗

図5に作製した足場の流動特性を示した. 足場の材料であるPDMSは, 変形しやすいので, 密閉するガラス板の圧着力により, 高さが変化する可能性があるため, 各測定のためにガラス板を脱着して変化を調べたが, 定常状態では有意な差はなかった. 図より, サンプルにより最大2倍程度の流動抵抗の差が存在した. また, 流量を増やすと, 全てのサンプルについて流動抵抗が低くなる傾向がみられた. これは, 高流量下でピラーが流れ剪断応力やピラー前後の圧力差に曝されることで流れ方向に倒れ, ピラーとガラス板に隙間が生じた為と考えられる. 測定した流量の範囲内では, 流動抵抗は最大約30%減少した. 尚, 著者らの既報の研究⁹⁾によれば, ピラー間流路の速度分布は層流で精度よく近似でき, その速度分布から計算されるバイオリアクター全体の流動損失も実測値とよく一致している.

3.3 足場内の細胞培養観察と細胞数

図6に播種1日と7日後の足場内のHepG2細胞の顕微鏡写真を示した. 図より播種後ほぼ7日目足場の底面およ

Fig.7 Oxygen concentration at inlet and outlet of bioreactor ($Q_v=0.537$ mL/min)

びピラーの側面上面に細胞がコンフルエントで接着していることがわかる. また, 細胞の一部は, 接着するだけでなく, 凝集体をつくって流路内に盛り上がっている部分も見られた.

表1に播種7日後の酸素代謝率測定に供する足場サンプル内の細胞数と, 酸素代謝率を測定した後の同じサンプル内の細胞数を示す. 表中には, バイオリアクターの容積で, 測定された初期の細胞数を除した値も記した. 細胞密度は足場の形状から予測される値の1.2~2倍程度で, 最大で肝小葉(Hepatic lobule)並の 2.13×10^8 cells/mL にもなっていることがわかる. これは, 細胞が凝集体となった影響と思われる. また, 酸素代謝率測定後の細胞数は, 初期の30~50%まで低下した.

3.4 バイオリアクターの酸素代謝率

図7にバイオリアクター出口における酸素濃度の時間変化の一例を示した. バイパス流路からバイオリアクターに切り替えてから, 出口酸素濃度は徐々に低下し, 十分な時間が経過すると一定値に落ちつくことがわかる. また, 測定終了後に再びバイオリアクターをバイパスした培養液の酸素濃度を測定したところ, 空気飽和濃度に戻ったので, 酸素センサーのドリフトの影響はないと考えられる. 尚, 入口側の酸素濃度はバッファーを通過することで空気飽和濃度に回復していることが, 図に示す同時に測定したバイオリアクター入口の酸素濃度より明らかなので, 本実験では出口側の酸素濃度と空気飽和濃度の差から酸素代謝率を計算した.

バイオリアクターを通過する体積流量に対する全サンプルの酸素代謝率を図8に示した. 全サンプルについて, 流量が増えるにつれて酸素代謝率が増えている. また, 同流量におけるサンプルごとの酸素代謝率は, $2\sim3 \times 10^{-10}$ mol/sec であり, 細胞あたりの酸素代謝率では, 概算で 3×10^{-17} mol/sec 程度になる. 酸素代謝

Fig.9 Microphotograph of bioreactor from top view (A bright zone is an area where cells are detached. An arrow depicts flow direction. $Q_v=6.9\text{mL/min}$)

率は、一つのサンプル(Sample 7)を除いて、ある流量で極大となった後に低下しており、その流量は1~2mL/minの範囲にあった。

4. 考 察

4.1 足場の微細構造の設計と流動特性 表1

に示した細胞密度が、設計の目標値に近いことから、本研究で提案した微細構造を設計する手法により、目標とする細胞密度から足場の微細構造がおおよそ決定できると考えられる。図4より、流路巾2bを広くとると、ピラーの高さは急激に低くなることがわかる。低いピラーは、ピラー自身の変形を抑えることが可能であるが、ピラーに付着する細胞の割合が減り、足場の上下面上に多くの細胞が付着することになる。但し、足場の高さが低くなることから、足場の上下面上の流れ剪断応力が高くなり、大部分の細胞が剥離し易くなるので、細胞剥離を考慮した流動特性からみると、ピラーの高さを低くすることは不利である。ピラー側面と足場上下面の流れ剪断応力と面積を考えると、正方形柱の微細構造では、流路巾とピラー高さが等しくなるとき、足場内の細胞を最も均一に維持できると考えられる。今回目標とした細胞密度では、この条件を満たす流路巾・ピラー高さ・ピラー辺長は、それぞれ約43 μm 、43 μm 、29 μm となる。細胞の付着面積(等価円で直径23 μm)を考えると、このピラーは細胞がようやく付着できる長さである。目標とする細胞密度を高くすると、本研究の設計法では、流路巾、ピラー高さ、共に小さな値となることから、本研究で設定した細胞密度は、ほぼ上限に近い密度と考えられる。

本研究で対象とした肝実細胞では、臨床応用上は、バイオリアクター全体の大きさとして最小でも肝小葉の基本単位の大きさである直径数mmの大きさが必要であるが、大きいほど望ましく、究極的には肝臓に近い大きさである1500mL程度まで実現できれば理想的である。しかしながら、物質輸送の観点からみると、

著者らの既報⁹⁾によれば、培養液中の酸素濃度は、上流から下流にかけて細胞の酸素代謝により低下していくので、大きすぎるバイオリアクターでは、後流側が酸素欠乏状態となり、細胞が死滅する可能性がある。バイオリアクター全面にわたって酸素濃度が十分であるためには、流量を増やす必要があるので、バイオリアクターの大きさの上限は細胞が剥離する流量により左右されると考えられる。

図5に測定した足場と同じ重量の肝臓に期待される流動抵抗を、ヒト肝臓の単位質量当たりの抵抗⁽¹¹⁾から算出して破線で示した。また、足場構造としてよく用いられる孔径250~500 μm の無秩序稠密空孔をもつ多孔質ポリ乳酸の流動抵抗を、測定した透過率⁽¹²⁾($=4.1 \times 10^{-12}\text{m}^2$)を用いてダルシー流れを仮定して算出した値を実線で示した。いずれの場合の流動抵抗も測定された規則性のある微細構造を持つ足場に比べて高い値を示している。このことは、流路の構造を規則的にすることで、足場表面に付着する細胞に作用する流れ剪断力を、飛躍的に下げ得ることを示している。特に流動抵抗を体内における値より低くできることは、同じ圧力差で*in vivo*に比べて高い流量を流し得ることを意味しており、流動特性の点のみからみると流路の構造化により、生体の機能を越えることができることを示唆している。但し、図6の付着の様子よりバイオリアクターの流動抵抗は、測定した足場のみの抵抗に比べて高くなっている可能性がある。

4.2 バイオリアクターの酸素代謝能 前節で示

した様に、最適設計された足場の流動特性は生体を越える可能性があるものの、酸素代謝能は生体に比べて非常に低い。図8に、バイオリアクター内の細胞が、2.1で設計した細胞密度 10^8cells/mL 、3.1で実測された微細構造から期待される細胞密度 $8.95 \times 10^7\text{cells/mL}$ および3.3で測定された測定開始前の実際の最大細胞密度 $2.13 \times 10^8\text{cells/mL}$ 、で存在して、*in vivo*の細胞酸素消費率に相当する $2 \times 10^{-16}\text{mol/sec/cell}$ で代謝をおこなっているとした時の酸素消費率を実測値と共に示した。測定された最大酸素消費率においても期待される酸素代謝の1/4~1/2程度に過ぎない。この原因は、実験結果より、大別して二つ考えられる。一つは、測定終了後の細胞数が初期の30~50%程度に減っていることから、ある流量以上で流れ剪断応力などにより細胞が剥離したり死滅していることが考えられる。実際に非常に高い流量における細胞の付着状態を顕微鏡観察したところ、図9の様な剥離が見られた。また、測定は細胞剥離を避けるために低流量より流量をあげつつ行ったので、測定の初期段階で特に後流領域の細胞は貧酸素状

態にさらされて死滅している可能性がある。従って、実際の培養にあたっては、バイオリアクター内の酸欠を避けるために、培養液の流量を速やかに上げる必要がある。二つ目の原因として、細胞表面における酸素輸送の境界層による物質輸送抵抗が大きいことが考えられる。図7のバイオリアクター出口の酸素濃度は、低流量であるにも関わらず100 μ M以上であり、流出培養液に未だ十分に酸素が存在していることを示唆している。しかしながら、バイオリアクターの酸素代謝率は流量が高くなるほど上昇しており、酸素代謝率が酸素供給量と正の相関がある。HepG2細胞の酸素代謝率は、酸素濃度が約数十 μ M⁽¹³⁾に至るまでほぼ一定であることを考えあわせると、細胞表面の酸素濃度が非常に低くなっている可能性がある。即ち、酸素輸送は、バイオリアクター内の培養液のバルク流の酸素濃度と細胞表面の酸素濃度差が非常に大きい、境界層輸送律速の状態にあると考えられる。

以上より、高密度培養された細胞に培養液の環流だけで酸素を必要十分な量を供給するためには、細胞表面の物質輸送抵抗を下げ、細胞の付着力を強固にする必要がある。細胞表面の物質伝達率を上げる為には、レイノルズ数を高くする必要があるが、細胞が付着していない状態の本測定におけるレイノルズ数は、本研究で用いた流量範囲の高い場合で1~10程度である。現状の細胞の付着力では、これ以上の流速の増加は剥離を促すことになる。シャーウッド数を用いると物質伝達率 α_D は、

$$\alpha_D = ShD/(2b) \quad (7)$$

と記述できるので、足場の微細構造をより微細化して細胞表面の物質伝達率を高くできる可能性があるものの、本研究で用いた四角柱の構造体では、細胞が付着できる限界の寸法なので、基本構造体の工夫が必要と考えられる。

5. まとめ

*in vitro*における高密度培養を目的として、足場の微細構造を設計・生産し、作製した足場の流動特性や、酸素代謝能を評価することで、以下のことがわかった。

- 1) 酸素が十分に供給される条件で、最適設計した足場微細構造により、*in vivo*並の細胞密度を達成できる。
- 2) 設計された微細構造をもつ足場は、本研究で対象となった肝臓の組織の流動特性を凌ぐ可能性があることから、微細構造の設計は、流動特性に対しては有効と思われる。
- 3) *in vivo*を模擬した酸素供給を、流入口が一カ所の培養液流のみに依存する系では、細胞表面の酸素輸送抵

抗による貧酸素環境と、高流れ剪断応力による剥離の影響で、*in vivo*の酸素代謝能に及ばない。酸素担体を用いない培養では、足場へのより強固な細胞付着力、足場構造のさらなる微細化の工夫が必要である。

文 献

- (1) Tateishi, T. ed., *Workshop Report of Cassete Tissue Engineering* (in Japanese), (1998), Society of Bioindustry.
- (2) Chan, C., Berthiaume, F., Nath, B.D., Tilles, A.W., Toner, M. and Yarmush, M.L., Hepatic Tissue Engineering for Adjunct and Temporary Liver Support: Critical Technologies, *Liver Transplantation*, 10 (11) (2004), pp.1331-1342.
- (3) Kulig, K.M. and Vacanti, J.P., Hepatic tissue engineering, *Transplant Immunology*, 12 (2004), pp.303-310.
- (4) Bettinger, C.J., Weinberg, E.J., Kulig, K.M., Vacanti, J.P., Wang, Y., Borenstein, J.T. and Langer, R., Three-dimensional microfluidic tissue-engineering scaffolds using a flexible biodegradable polymer, *Advanced Materials*, 18 (2006), pp.165-169.
- (5) Yang, J., Woong Chung, T., Nagaoka, M., Goto, M., Cho, C.S. and Akaike, T., Hepatocyte-specific porous polymer-scaffolds of alginate/galactosylated chitosan sponge for liver-tissue engineering, *Biotechnology Letters*, 23 (2001a), pp.1385-1389.
- (6) Karageorgiou, V. and Kaplan, D., Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis, *Biomaterials*, 26 (2005), pp.5474-5491.
- (7) Leclerc, Y., Sakai, Y. and Fujii, T., Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of PDMS (polydimethylsiloxane), *Biomedical Microdevices*, 5 (2) (2003), pp.109-114.
- (8) Kojima, N., Matsuo, T. and Sakai, Y., Rapid Hepatic Cell Attachment onto Biodegradable Polymer Surfaces without Toxicity Using an Avidin-Biotin Binding System, *Biomaterials*, 24(28) (2006), pp.4904-4910.
- (9) Provin, C., Takano, K., Sakai, Y., Fujii, T. and Shirakashi, R., A method for the design of 3D scaffolds for high-density cell attachment and determination of optimum perfusion culture conditions, *Journal of Biomechanics*, 41 (2008), pp.1436-1449.
- (10) Takano, K., Provin, C., Sakai, Y., Fujii, T. and Shirakashi, R., Study on flow characteristics and oxygen metabolism of bioreactor for high-density culture, *Proc. 45th National Heat Transfer Symposium of Japan*, II+III (2008), pp.715-716.
- (11) Toida, N. and Uchizono, K. Ed., *Textbook of Modern Physiology* Vol.2, p.328, (1968), Igakushoin Ltd.
- (12) Takano, K., Provin, C., Sakai, Y., Fujii, T. and Shirakashi, R., Fundamental Study on Mass Transport in Scaffold for Engineering Tissues, *Proc. 43th National Heat Transfer Symposium of Japan*, II (2006), pp.517-518.
- (13) Jones, D.P. and Mason, H.S., Gradients of O₂ concentration in hepatocytes, *The Journal of Biological Chemistry*, 253 (14) (1978), pp.4874-4880.