

物理的圧迫状態で顕微鏡観察ができる新規培養チャンバーの開発

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
総合研究支援センター 技術専門員 庄野 正行



概説

現代社会の生活習慣病の中の心筋梗塞、脳梗塞は、高血圧によることが大きな原因である。そこで血管内皮細胞の圧迫病変における細胞傷害のメカニズムを解明するためには、正常ヒト臍帯静脈内皮培養細胞 (HUVEC) を用いて、物理的圧迫状態で細胞の形態を観察しながら、薬物投与ができる培養チャンバーが必要になる。現在一般的に使用されている培養チャンバーは、培養液や緩衝液を還流しながら顕微鏡下で観察や測定ができるが、物理的な圧迫をしながら顕微鏡下で観察や薬物の投与は不可能である。また、長期的な培養を行うためには、細胞毒性がなく、高温（120℃）での蒸気滅菌が可能な耐熱性に優れた素材でなければならない。これらを総合的に適用できる新規培養チャンバーを開発した。

技術の概要

テフロンをNC加工により円筒段差加工を行ない、その横から、約1.0mmの横穴をあけ、生細胞に培養液が循環できるようにした。さらに、松浪ガラス社の35mmシャーレにカバーガラス（20mm丸）でボトムガラスシャーレが丁度入るようにステンレスで円筒形にNC旋盤で加工した。ステンレスの内側にはネジ加工を行ない、テフロンの周囲もそれに入るネジ加工を施した。また、テフロンの中央部は透過照明光が入射して細胞観察ができるように石英ガラスをはめ込んだ。測定を行なうための画像撮影はニコン倒立蛍光顕微鏡とニコンCCDカメラSD-L1を使用した。



図1. 新規開発培養チャンバーの本体

企業の概要

ネッパジーン株式会社は、バイオテクノロジーの先端技術装置等の開発および販売をしており、業務内容及び営業品目は、遺伝子導入装置、細胞融合装置、In Vivo・In Vitro用各種電極、超音波遺伝子導入装置、超音波エコー装置、細胞形態・動態数値計測解析システム、培養細胞ストレッチ装置、暗視野用光ファイバー照明器具、微小カッティング装置、DNA精製キット、シェアストレスチャンバー、小型プログラムフリーザー、その他バイオ関連製品の輸出入・販売である。詳細についてはネッパジーン株式会社ホームページ (<http://www.nepagene.jp/>) を参照下さい。

上市までの道のり

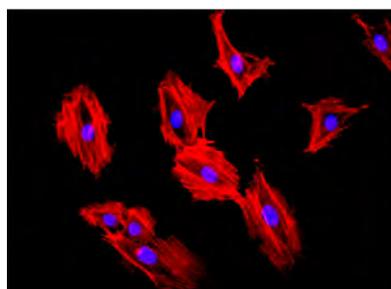
約30年前から培養チャンバーを試作してきた。始めはガラス管を熱加工して毛細管を作りその中で培養する方法や、ガラス板を特殊な接着剤で張り合わせて加工したり、アクリル板を加工して様々な培養チャンバーを改良してきた。約3年前にネッパジーン株式会社の営業マンをエィコーサイエンス株式会社から紹介して頂き、本格的に徳島大学と共同開発を行うために開発予算を獲得することができた。この予算のおかげで今回の開発がはじまった。ネッパジーンからの要望は、35mmプラスチックシャーレがそのまま使用でき、しかも蒸気滅菌ができ、細胞毒性が少ない培養チャンバーであった。この条件を満たす材料を選択することが最大の難難であったが、約30年間に様々な材料を用いて培養チャンバーに挑戦してきたおかげで、多種多様な材料の中から選択することは容易であった。次の難関は、加工図面を作成することであった。これも学生時代に精密機械科等を専攻しており、機械図面検定を取得していたので、専門的な機械加工図面を作成することができた。しかしながら出来上がった培養チャンバーは次から次へと問題点がでてきた。それを一つ一つ克服してやっと2012年12月末カタログが作成され血管生物学会で初めて公開展示された。

実験例

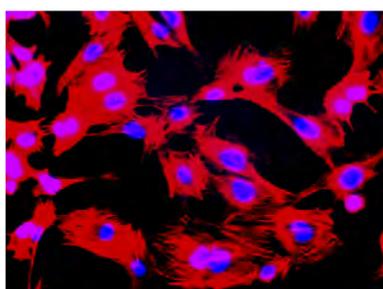
HUVEC細胞に物理的圧迫によるアクチンの変化の実験例では、ペリスタルポンプを2台使用して、150mmHgの物理的圧迫下で30分間処理を行なった。アクチンフィラメントの変化を観察した結果、対照に比べて物理的圧迫を加えた細胞は、繊維の数と太さが増加していた。



図2. 加圧ゲージおよび温度コントロール



対照



150mmHg加圧30分後

図3. HUVEC培養細胞3日後、左は対照、右は加圧処理30分後 PFA4%で固定、ファロイジンとDAPI染色。