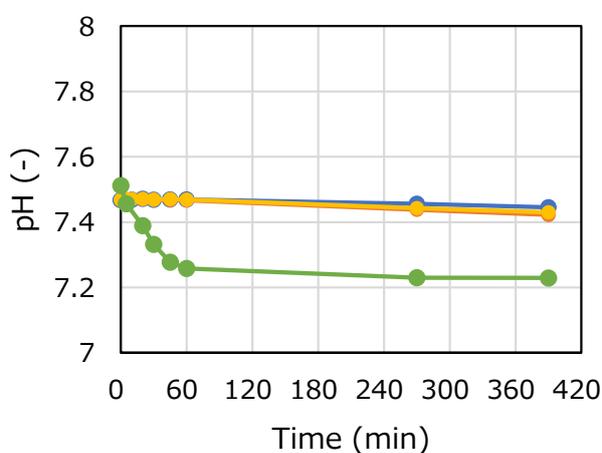
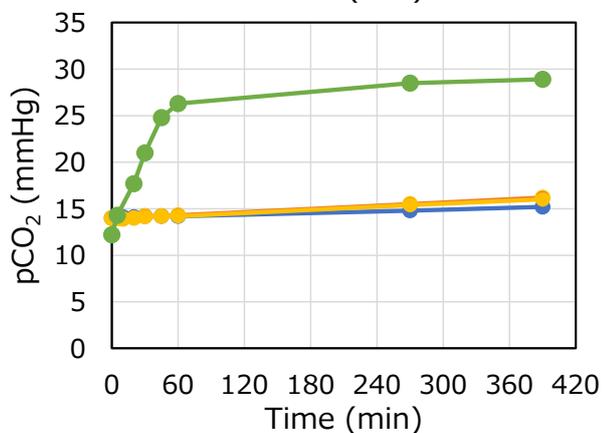
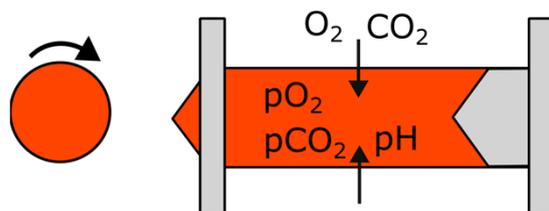
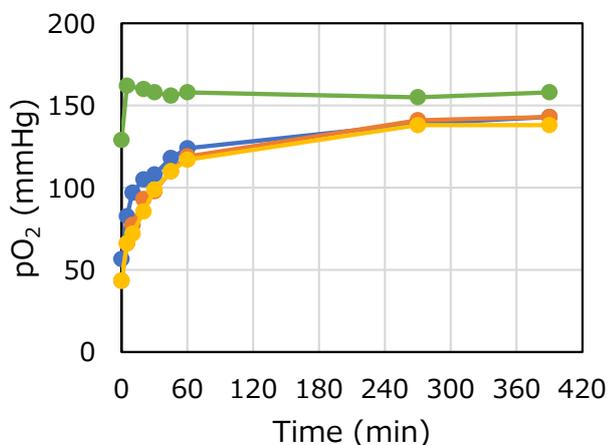


ディスポーザブル培養ベッセルのガス透過性評価

閉鎖系培養器材のガス透過性、特に酸素透過性は細胞を培養する上で非常に重要である。そこで、CellPet 3D-iPS用ディスポーザブル培養ベッセルのガス透過性を評価するために、窒素バブリングにより培地中に溶けているガスを追い出したのち、培養ベッセルに培地を入れ、CO₂インキュベータ内で回転させながらインキュベートし、培地分析装置によりガス分圧を計測した。さらに、細胞培養時の酸素消費速度に対してベッセル内に十分に酸素が透過して培地中に溶け込んでいるか評価するため、iPS細胞培養下でのガス分圧を計測した。

ベッセルのガス透過性

培地AK02N (Ajinomoto) に窒素バブリングを施し、培地中に溶けている酸素、二酸化炭素を取り除いたのち、10 mL, 30 mL, 50 mL ディスポーザブル培養ベッセルに各最大容量の培地を充填した。5% CO₂環境の細胞培養インキュベータ内にCellPet 3D-iPSを設置し、40 rpmでベッセルを回転させた。各時間において、培地成分分析装置ViCell MetaFLEX (Beckman coulter) を用いて酸素分圧 pO₂、二酸化炭素分圧 pCO₂、水素イオン指数pHを計測した。開放系である60 mm dishではpO₂、pCO₂ともに速やかにガス分圧が定常状態となったのに対し、ディスポーザブル培養ベッセルではどの容量でもpO₂はおおよそ5時間程度で定常状態に到達していることを確認できた。pCO₂は60 mm dishでは60 minでほぼ定常状態となったのに対し、培養ベッセルでは非常に緩やかな増加であり、それを反映してpH変化も緩やかであった。



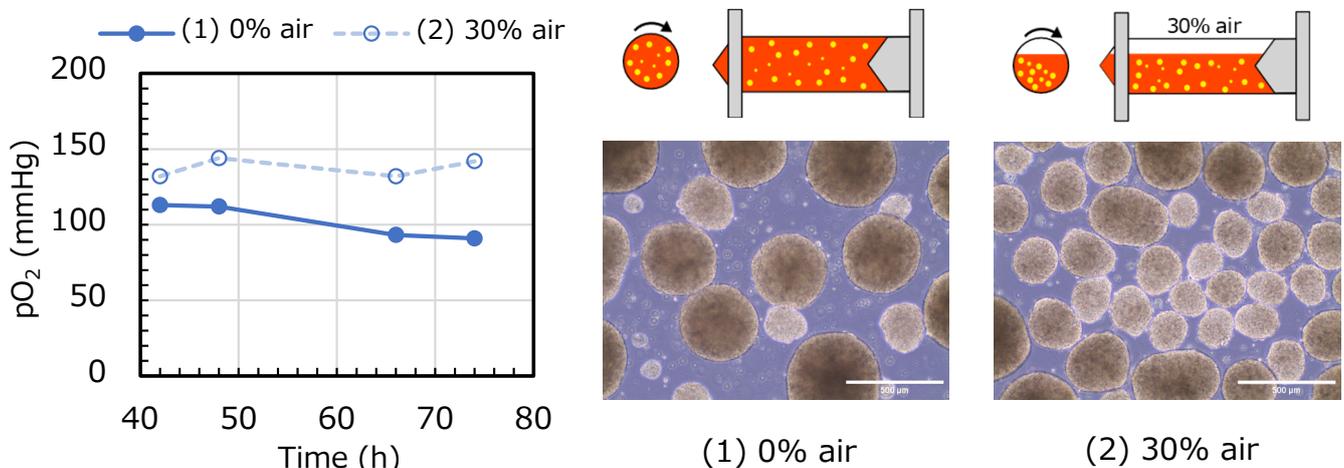
● 10 mL vessel ● 30 mL vessel ● 50 mL vessel ● 60 mm dish

ディスポーザブル培養ベッセル内の培地ガス分圧とpH

iPSスフェロイド回転浮遊培養中の培養ベッセルのガス分圧

iPS細胞 (253G1) をディスポーザブル培養ベッセル内で3日間回転浮遊培養したときの pO_2 を評価した。ここで、培地中への酸素の溶け込みの違いを検討するため培養条件を2通り、(1) ベッセル内をすべて培地で満たした状態、(2) ベッセル内に30%気相を含んだ状態とした。

0%気相では時間経過ごとに pO_2 は低下した。一方、30%気相ではおよそ140 mmHgで維持されていた。3日間培養したあとの細胞増殖率はそれぞれ(1) 240%、(2) 290%であった(初期播種密度 1×10^5 個/mL)。30%気相条件の方が細胞密度が高いことから細胞の酸素消費速度は大きくなると想定されるが、ベッセル内の気液界面で効率よく酸素を培地内に溶解できているために、細胞増殖に伴う酸素消費速度が上昇しても酸素分圧を維持したまま培養できたと考えられる。前述の評価でベッセルのガス透過性を確認したように、0%気相条件でも樹脂ベッセルを介して培地中に酸素は透過しているものの細胞の酸素消費速度の方が大きいため、 pO_2 は徐々に低下していた。なお、気相の有無によるベッセル内の流れ場の変化も観察されていることから、iPS細胞の増殖率と、スフェロイドの粒径についても影響していることが示唆される。



iPSスフェロイド培養過程におけるディスポーザブル培養ベッセルの培地中の酸素ガス分圧

まとめ

CellPet 3D-iPS用のディスポーザブル培養ベッセルのガス透過性を評価した。培地中のガスを除去した状態で培養ベッセルに培地を充填し、ガス分圧の時間変化を評価したところ、酸素ガスは5時間ほどで定常状態に到達することを確認できた。ただし、二酸化酸素ガスの透過性は低く、それに伴いpH変化も緩やかであった。iPSスフェロイドの回転浮遊培養中の培地内の酸素分圧を評価したところ、ベッセル内に気相を設けることで酸素分圧を維持したまま培養できることが明らかとなった。細胞密度にも依存するが、酸素要求性の高い細胞を培養する際にはベッセル内に気相をいれることで酸素分圧を維持できることが示唆された。