

機能性人工殻の表面微細加工により実現される ニワトリ胚の長期培養方法の開発

九州工業大学大学院生命体工学研究科・准教授 川原 知洋

■ 緒 言

近年、動物実験の規制厳格化に伴い大型動物の使用が難しくなっており、マウス等などについても同様に削減の方向で議論されている。しかしながら、創薬や超微細手術などの高度先進医療技術を発展させるには、生体を用いた試験や訓練が最も効果的であり必要不可欠である。一方で、薬効評価などの一部の試験については代替動物(ゼブラフィッシュ等)の初期胚を用いて試験を行う方法が提唱されており¹⁾、例えば、胚の表面(例えばしょう尿膜表面)にヒト癌細胞を培養して薬剤試験を行うような方法が確立されている²⁾。

本研究では代替動物の中でも、安価に培養でき、かつ、実験に使用する際の制約が比較的小さいニワトリ胚(卵)に着目している。一方で、胚は卵殻で覆われているため内部を自由に観察・操作できないという本質的な問題がある。これに対し、古くから酸素透過性の高いフィルムと透明容器を用いて人工殻を作成し、血管形成前の胚を容器に移して内部を観察しながら培養する方法が用いられているが³⁾、これらの研究では人工殻自体の最適な剛性や形状を考慮して設計されておらず、狙った部分を詳細に観察したり操作することが難しかった。

以上の点を踏まえて、筆者らは機械工学的な観点から高剛性フレームと酸素透過膜を組み合わせた新しい透明人工殻の設計方法と作成方法を開発しており(図1)⁴⁾、図2に示すようにニワトリ胚を培養しながら任意の姿勢からの観察と力学アクセスを同時に実現できることを示している。一方で、ニワトリ胚を10日間(孵化に必要な半分の期間)培養する場合には高い生存率が得られるものの、それ以降は急激に生存率が低下し、孵化に必要な21日数までの培養ができなかった。これは、通常の卵殻には含まれている成長因子(カルシウム成分等)が、人工殻には含まれておらず、ニワトリ胚の成長が停止してしまうからであると考えられる。

したがって、本研究課題では、成長因子を含む人工殻を新たに開発するとともに、最終的には孵化(21日間培養)を達成することを目指して、ニワトリ胚を長期培養するための条件について考察を行なった。

■ 方 法

1. 必要なカルシウム量の推定

従来研究において、ニワトリ胚の成長に伴って卵殻からはミネラル成分が放出されており、特にカルシウムが骨の形成などに大きく関与していることが明らかになっている^{5,6)}。この知見(培養日数と消費カルシウム量の関係)を踏まえ、本研究で用いる乳酸カルシウムについて、ニワトリ胚の成長に必要な総量と供給タイミングを算出した。また、実験では(i)乳酸カルシウムを人工殻の中にシリンジで直接注入する方法と、(ii)人工殻の中に混合させて放出する方法の2通りを試みた。

2. 人工殻の作製

人工殻のフレーム部分は40mm角のポリカーボネートブロックに対して機械加工を行い作製した。また、酸素透過膜についてはプラスチックディッシュにジメチルポリシロキサン(PDMS)を塗り広げ、所望の厚みになるまで放置した後、ホットプレートでベイクして硬化させる。厚みについては、0.3~0.5mmのものを作製した。最終的に、フレームに酸素透過膜を貼り付けることで人工殻を構成した。

同様の方法で、酸素透過膜(PDMS)にカルシウム粉末を一定の割合で混合したものについても作製した。また、シリコンウェハ基板上にフォトリソグラフィ加工でパターンを形成し、これをモールドとしてカルシウムを混合した酸素透過膜に転写したものについても作製した。

3. ニワトリ胚の移植と培養

有性卵をインキュベータ(温度39℃、湿度80%)で3日間培養した後、UVランプで滅菌処理を行った人工殻に移し替える(ニワトリ胚が大きく成長したあとに移植を実施すると、移植の際に出血

が生じて生存率が著しく低下してしまうため)、最終的に人工殻の上面にも酸素透過膜を配置して密封する。なお、ニワトリ胚を用いた実験に関しては「九州工業大学動物実験等に関する規定」に則って、事前に実験計画書を学内の動物実験委員会に提出して承認を受けた上で実施した。また、ニワトリ胚への苦痛や使用量をできるだけ低減できるように配慮した。

4. 評価

酸素透過膜(PDMS)中に混合したカルシウム放出量については、ニワトリ胚を移植した後に胚に吸収されている量を計測することが原理的に難しかったため、事前に純水中に溶け出す量を吸光度測定器によって計測し評価の目安とした。

また、ニワトリ胚の生存の有無については、ニワトリ胚全体の動作や心拍を直接カメラで計測することで評価した。これに伴い、ニワトリ胚の成長の様子をタイムラプス撮影が可能なシステムについても新規に開発した。図3にその外観を示す。3つの電動ステージを用いてカメラが取り付けられたデジタルマイクロスコープをXYZ方向に移動させることができ、カメラの位置決め及び撮影タイミングはコンピュータによって制御される。実験ではインキュベータの外側から窓を通してタイムラプス撮影を行なった。

■ 結果

1. 乳酸カルシウムを人工殻の中にシリンジで直接注入した場合

まず、カルシウムを添加する効果の確認を行なうために、乳酸カルシウムを純水に溶かして人工殻の中に注入しながら培養を行なった場合の生存率を調査した。結果を図4に示す。また、図5は培養途中に撮影したニワトリ胚の様子をまとめたものである。ここで、添加するカルシウムの総量は0.3gで統一しており、それぞれの条件は以下のようになっている。

条件1：カルシウムを加えない場合 (Control, N=5)

条件2：培養3日後(移植直後)に0.3gのカルシウムを添加した場合 (N=5)

条件3：培養後10日後に0.3gのカルシウムを添加した場合 (N=9)

条件4：培養後7日後に0.1gを添加、10日後に0.1gを添加、14日後に0.1gを添加した場合 (N=8)

結果より、条件2のように移植直後にカルシウムを添加するとすぐに胚の成長が止まってしまうことが確認できた。一方で、条件3と条件4のものでは、従来のカルシウムを加えない場合と比較して培養可能期間が大幅に長くなっており、孵化直前の21日目まで成長した個体が複数あった。図6はこれらの個体を人工殻から取り出して撮影したものである。いずれの条件においても孵化するには至らなかったが、特に条件3については個体の大きさとしては通常の卵殻で培養したものと同等の大きさまで成長していることが確認できた。以上の実験により、適切な量のカルシウムを適切なタイミングで添加することで人工殻においても少なくとも孵化直前までは培養を継続できることを確認できた。

2. 人工殻の酸素透過膜中にカルシウムを混合させた場合

次に、カルシウムを酸素透過膜に混合させて放出する方法について検討を行なった。ここでは、乳化カルシウムとPDMSの質量比を1:1, 1:1.5, 1:2の条件で酸素透過膜を作製して実験を行なった。作製した人工殻の例を図7に、生存率を調査したものを図8に示す(全てN=5)。結果として、この場合はほぼすべてのケースで培養10日目までに胚の成長が停止した。また、表面に幅100 μm オーダーのスリットパターンを施したもので培養を行なっても同様の傾向が見られた。そこで、人工殻から放出されているカルシウムの総量について吸光度測定器で測定を行なった。結果を図9に示す。結果から分かるように、放出されているカルシウムの総量としては大きな問題がないものの、膜からは短時間で一定量のカルシウムが溶け出し、その後はほぼ一定の値を示している。このことが、成長に悪影響を与えている原因であると考えられる。

■ 考察

上記の結果より、カルシウムを混合させた酸素透過膜(PDMS)の表面ではごく浅い範囲のカルシウムだけが短期間にすばやく溶け出していると考えられる。したがって、培養させながらカルシウムを適切なタイミングで放出するためには、膜の作製方法をさらに検討する必要がある。今後は、酸素透過膜を多層構造にするなどの対策により、外部からの注入を必要とせず、卵殻と同じような機能を有する人工殻を開発する必要がある。

一方、孵化についても現状では達成できていないが、原因としては雛が自立的に人工殻を開けることができないということが挙げられる。こちらについてもタイムラプス撮影を行ないながら、人工殻の外に出すタイミングをヒトに知らせるような機能をシステムに付加することを考えている。今後は、カルシウム量と与える時期のさらなる最適化を行なうとともに、最終的には孵化を目指して雛が孵化直前まで生存する確率を向上させるための取り組みを進めていく予定である。

■ 要 約

人工殻内でニワトリ胚を長期間培養して孵化させることを目指して研究を行い、通常の卵殻の機能に着目してカルシウムの供給を行なった。成果をまとめると以下のようなになる。

- ・人工殻内に注入すべきカルシウムの適切な量とタイミングの適切な値を見出すことができた。
- ・実際に人工殻内でニワトリ胚を培養することで、従来は 14 日程度であった培養可能日数を 21 日目まで継続できることを確認した。
- ・人工殻からカルシウムを放出させる場合には、多層構造にするなどさらなる改良が必要であることが分かった。
- ・ニワトリ胚専用のタイムラプス撮影システムを開発し、成長や生存率の評価に用いた。

今後も、積極的に微細加工技術などを導入することで人工殻を機能化し、代替動物実験を行なうためのバイオ医療プラットフォームとしての開発を進めていく予定である。

■ 文 献

1. Seabra R, Bhogal N (2010) In vivo research using early life stage models. *In Vivo* 24, 457-462.
2. Liu M et al.(2013)The histone methyltransferase EZH2 mediates tumor progression on the chick chorioallantoic membrane assay, a novel model of head and neck squamous cell carcinoma. *Transl Oncol.* 6, 273-281.
3. Kamihira M et al.(1998)Improved hatching for in vitro quail embryo culture using surrogate eggshell and artificial vessel. *Dev Growth Differ.* 40, 449-455.
4. Huang W et al.(2015)Egg-in-Cube:design and fabrication of a novel artificial eggshell with functionalized surface. *PLOS ONE* 10.1371/journal.pone.0118624, 1-20.
5. Johnston PM, Comar CL(1955)Distribution and contribution of calcium from the albumen, yolk and shell to the developing chick embryo. *Am J Physiol.* 183, 365-370.
6. 藤田ら(2007)ニワトリ発生過程における骨形成に関するミネラル動態の検証. *日本畜産学会報* 78, 155-160.

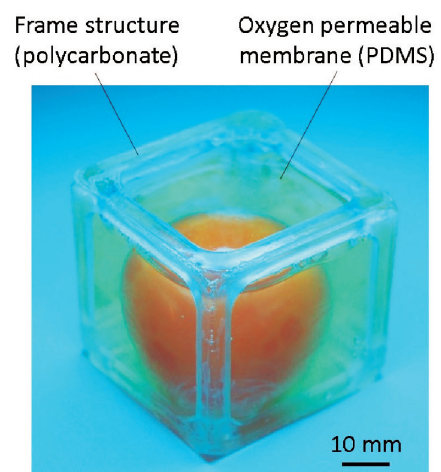
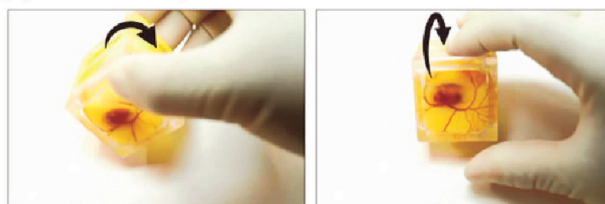


図1 透明人工殻の外観

(a) Observability



(b) Accessibility

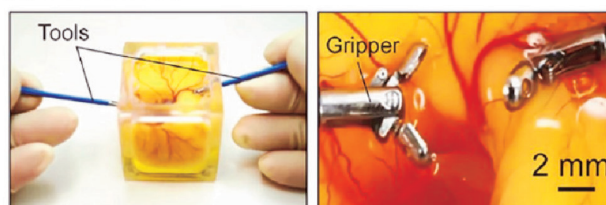


図2 人工殻の高い観察性とアクセス性

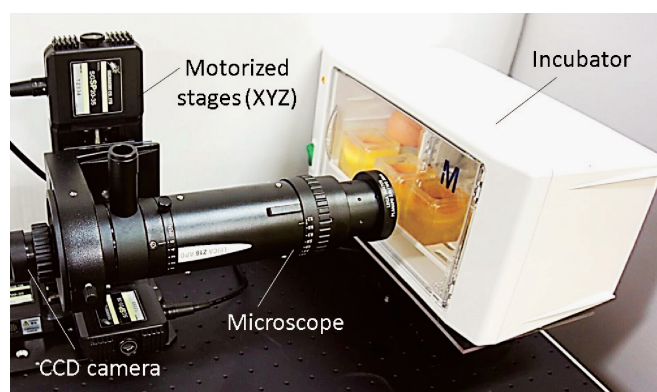


図3 タイムラプス撮影システムの構成

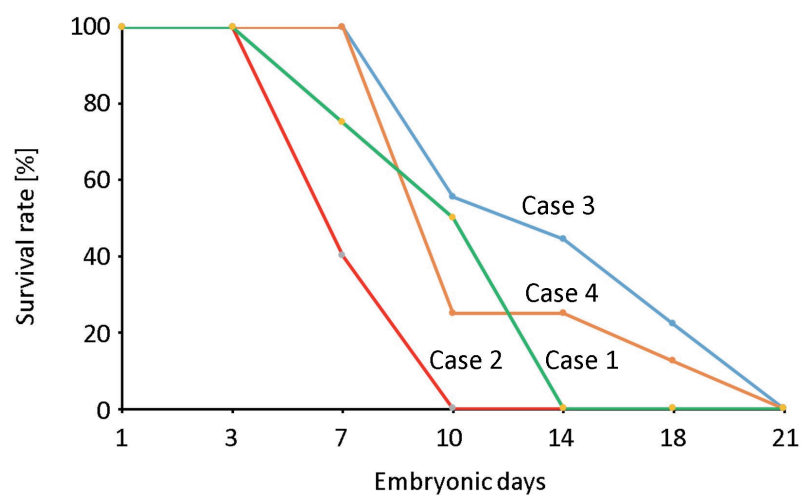


図4 ニワトリ胚生存率の評価
(乳酸カルシウムを人工殻での培養中に注入した場合)

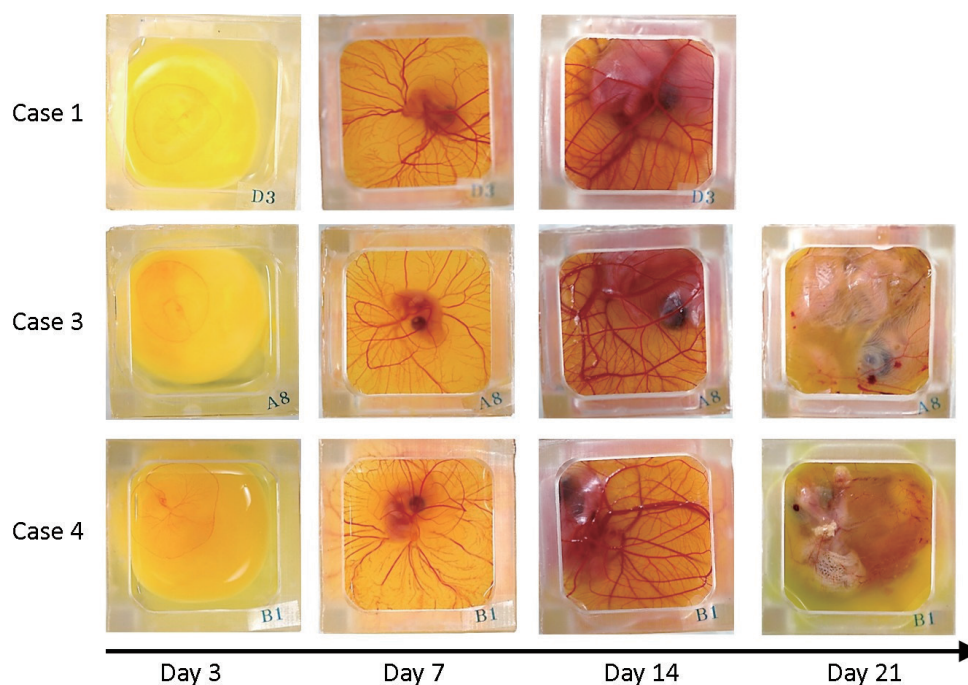


図5 人工殻内におけるニワトリ胚の成長の様子(上面から撮影)

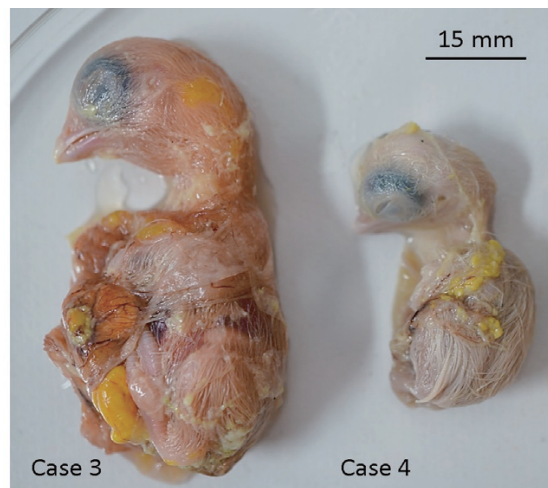


図6 人工殻内で21日間培養した個体の一例

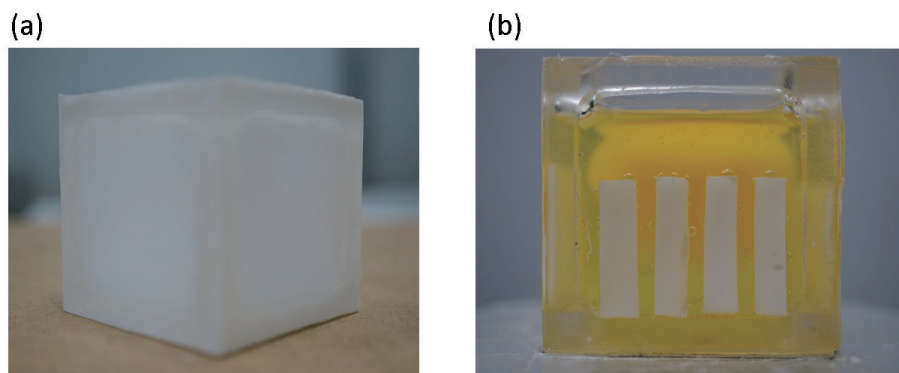


図7 カルシウム放出機能を有する人工殻

- (a) 上面以外の酸素透過膜に乳酸カルシウム粉末を混合させたもの
 (b) 観察性を確保するために膜の一部だけカルシウム放出機能を有するもの

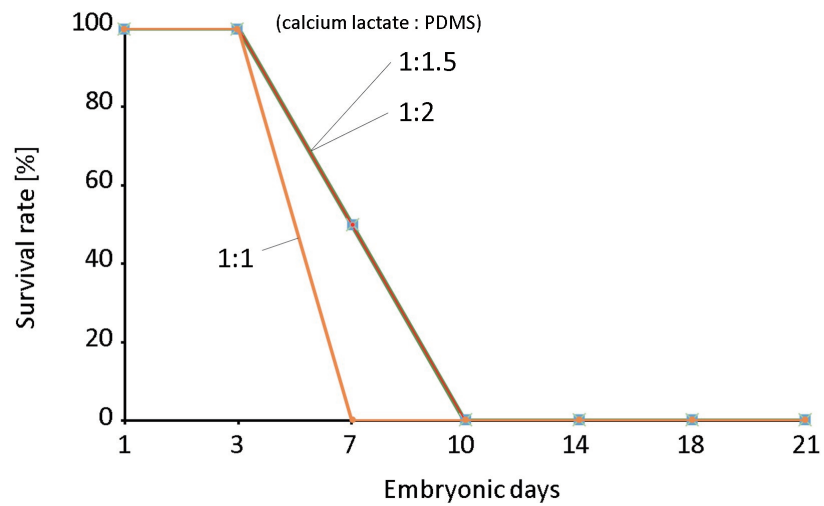


図8 カルシウム放出機能を有する人工殻内で培養したニワトリ胚の生存率

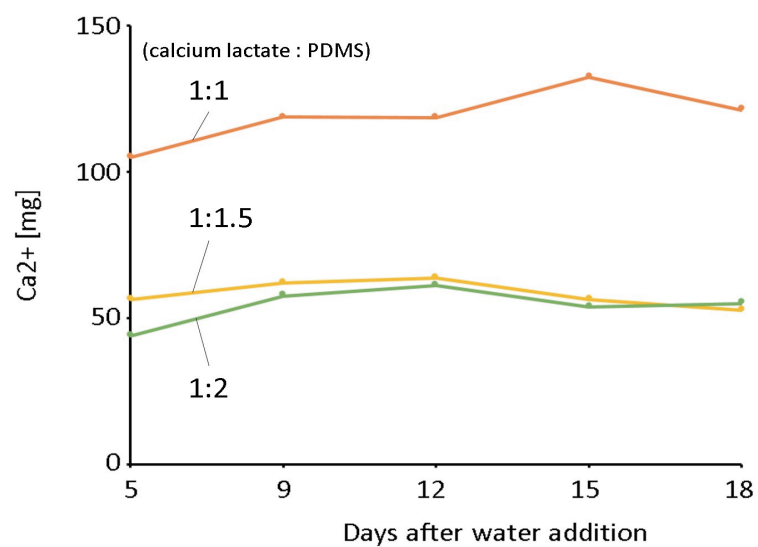


図9 人工殻内のカルシウム濃度の経時変化