

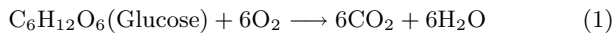
# [B11] 接着細胞のエネルギー代謝の測定

知能機械工学科 山田研究室  
0214108 吉田 知水

## 1 緒言

近年の医療技術の高度化に伴い、生体組織工学の分野では生体外において細胞スケールから特定の生体組織をつくる試みが検討されている<sup>[1]</sup>。この問題点として、現状では細胞の代謝率の培養環境による影響の知見<sup>[2][3]</sup>が不足しており、生体程度の高密度培養を行うことができる適当な流路構造が確立されていない。流路構造の解明は生体外での3次元高密度培養を可能にし比較的大きな組織をつくるために必要不可欠である。

細胞は外界から様々な物質を取り込み、複雑な代謝を行いエネルギーを生み出している。この主要な代謝系として解糖が存在する。解糖は酸素が十分な環境では式(1)に示す反応によりグルコースから水と二酸化炭素にまで分解される。本研究ではこの解糖に注目し、酸素が十分供給される環境での酸素代謝率、グルコース代謝率を測定することを目的とする。



## 2 実験装置と測定方法

本研究では生体を模擬した一定流量の培養液を供給する開放系の下で、初期溶存グルコース濃度をパラメータとし、低グルコース濃度における酸素代謝率、グルコース代謝率を測定した。測定サンプルとして接着細胞であるヒト肝ガン由来株細胞 HepG2(RCB0459)を、図1に示す測定用容器に組み込むカバーガラスに培養したものを用いた。計測は図1に示す各位置で培養液サンプルの溶存酸素濃度、溶存グルコースを測定し、式(2)(3)を用いて酸素代謝率、グルコース代謝率を求めた。

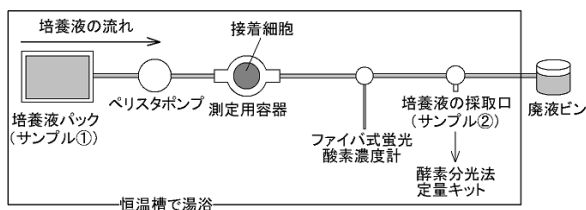


図 1: 測定系の構成図

酸素代謝率  $Met_{O_2}$ 、グルコース代謝率  $Met_{Glu}$  は測定容器を通過する前後の溶存酸素の濃度差  $\Delta D_{O_2}$  と溶存

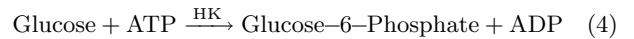
グルコースの濃度差  $\Delta D_{Glu}$ 、流量  $Q$ 、細胞数  $N$  より式(2)(3)で表される。

$$Met_{O_2}[\text{mol}/(\text{s cell})] = \frac{\Delta D_{O_2}[\text{mol}/\text{l}] \times Q[\text{l}/\text{s}]}{N[\text{cell}]} \quad (2)$$

$$Met_{Glu}[\text{mol}/(\text{s cell})] = \frac{\Delta D_{Glu}[\text{mol}/\text{l}] \times Q[\text{l}/\text{s}]}{N[\text{cell}]} \quad (3)$$

溶存酸素濃度はセンサー部での酸素消費がなく高精度であるファイバ式蛍光酸素濃度計 (Ocean Optics FOXY-R) を用いた。

溶存グルコース濃度は一定時間毎に培養液をサンプリングをし、酵素分光キット (Megazyme D-GLUCOSE-HK) を用いて測定した。サンプリングした培養液に酵素を添加し、グルコースから下式(4)(5)の反応式を経て生成した NADPH の吸光波長 340nm での吸光度を測定した。この吸光度から NADPH 量を同定し、NADPH 量と 1 対 1 の関係をもつ溶存グルコース量を求めた<sup>[4]</sup>。HK、G6P-DH はそれぞれの反応を促す酵素を示す。



少ない細胞数での定常測定が簡便に行える様に測定用容器を設計した。

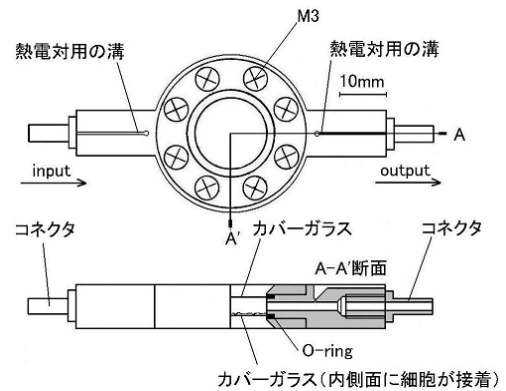


図 2: 測定用容器

左右のコネクタ部に流入流出それぞれチューブをつなぎ、容器中心の表裏に 1 枚ずつカバーガラスを固定して流路を密閉できる構造となっている。このカバーガラスの一方に細胞を接着させた。

### 3 測定結果と考察

本実験を通じて一定としたパラメータの測定値を表 1 に示す。なお初期溶存酸素濃度は 37 での飽和値 6.86[mg/l] で一定とした。

表 1: 各定数の測定値

測定時の温度	pH	細胞数	生存率
37.0±0.3	8.1±0.2	182000±48000	73.5±8.7 %

時間経過に伴う酸素代謝率、グルコース代謝率の変化の代表例を図 3 に、初期溶存グルコース濃度に対する酸素代謝率、グルコース代謝率の変化を図 4 に示す。各条件における測定は一回のみで代謝率は溶存酸素濃度あるいは溶存グルコース濃度の測定機器の精度から誤差を算出した。

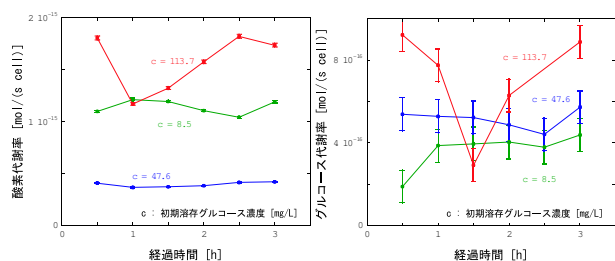


図 3: 経過時間と酸素代謝率、グルコース代謝率の関係

酸素代謝率、グルコース代謝率の時間変化は初期溶存グルコース濃度  $c=113.7$ [mg/l] を除きほぼ一定であった。これより 3 時間の測定でほぼ安定した代謝が行われていることが確認できる。

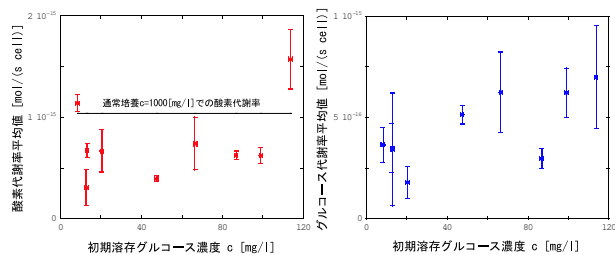


図 4: 初期溶存グルコース濃度と酸素代謝率、グルコース代謝率の関係

本実験では特に低グルコース濃度での細胞の代謝率測定を行った。比較として通常培養で用いる溶存グルコース濃度  $c=1000$ [mg/l] 培養液による酸素代謝率の測定結果を示す。図 4 において初期溶存グルコース濃度の増大とともに代謝率が向上する傾向が見られるが、通常培養における酸素代謝率の測定結果はこの傾向からはずれており、初期溶存グルコース濃度と代謝率の関係は見極められない。

細胞にとっての至適 pH は  $7.2 \pm 0.2$  であるが、代謝率測定時の培養液 pH は 7.9~8.3 と高い値が測定された。

この原因として本実験で用いた培養液 (D-MEM) は pH 緩衝剤として炭酸水素ナトリウムを含み、緩衝効果は 37、5% CO<sub>2</sub> 環境下で至適 pH を維持するものであることが考えられる。即ち本測定系のように 5% CO<sub>2</sub> を連続供給することが困難な系では CO<sub>2</sub> の濃度が不足していたため高 pH で平衡を保ってしまったと思われる。測定前後での細胞生存率を測定した結果、代謝率測定時間内に約 15% の細胞が死滅していた。この環境では正常な代謝活動が行われず、目的である正常培養時の代謝率測定が行えていなかったと考えられる。

図 4 より酸素代謝率とグルコース代謝率の比は約 2:1 である。式 (1) より完全な好気代謝が行われるとその比は 6:1 であり、これより嫌気性代謝が行われていたことが示唆される。測定環境 37 での飽和溶存酸素を供給し、その 20% しか消費されていなかった。この結果から、本測定環境では十分な酸素供給が行われていても供給量の約 75% のグルコースが嫌気代謝によって消費されたと考えられる。

### 4 結言

本実験で得られた代謝率は細胞にとって高 pH での測定結果であったため、通常の代謝活動とは異なると考えられる。目的として、正常な代謝活動が行われる環境での代謝率の測定を行うという前提があり、本実験ではこの目的を達成することができなかった。そして代謝率の誤差が大きく初期溶存グルコース濃度に対する代謝率の傾向の見極めが困難であった。一方で設計した測定系は従来に比べ代謝率測定を非常に簡便に行うことができ目的を満たすことができた。

### 参考文献

- [1] 岩田博夫. 生体組織工学. 産業図書株式会社, 平成 7 年. 篠義人 監修.
- [2] Steven Charles NICHOLS. *A MICROCALORIMETRIC STUDY OF ENERGY CHANGES DURING BACTERIAL GROWTH*. PhD thesis, University of London, 1980.
- [3] PhD Susan R. S. Bibby, PhD Deborah A. Jones, PhD Ruth M. Ripley, and othes. Metabolism of the Intervertebral Disc: Effects of Low Level- sof Oxygen, Glucose, and pH on Rates of Energy Metabolism of Bovine Nucleus Pulposus Cells.
- [4] ベルグマイヤー. 酵素分析法. 廣川書店, 昭和 59 年. 共訳 山羽 力 早川 堯夫 谷本 剛 pp. 53.