

1155 軟骨細胞の三次元培養

福井勇起<sup>1</sup>, ○松田親敬<sup>1</sup>, 脇谷滋之<sup>2</sup>, 高木 睦<sup>1</sup>, 吉田敏臣<sup>1</sup> (<sup>1</sup>阪大・ICBiotech, <sup>2</sup>信州大学・整形外科)

【目的】軟骨再生を目指し、関節初代軟骨細胞の三次元培養方法を確立する。  
【方法】ブタ大腿関節から分離した初代軟骨細胞を、ウシ胎仔血清、アスコルビン酸りん酸エステルを含む MEM 培地を用いて培養した。すなわち、生体吸収性ポリマーである PLGA メッシュを厚さ 2 mm となるように 96 マルチウェル (0.32 cm<sup>2</sup>) 中に重ねて入れ、軟骨細胞を含んだアテロコラーゲン 65  $\mu$ l を注入し、37°C で 30 分間ゲル化させた後、培地を 260  $\mu$ l 重層し、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下で培養を開始した。比較対照として、5.0×10<sup>5</sup> cells/ml の細胞懸濁液 0.5 ml を 900 rpm、5 分遠心した後、そのまま培養するペレット培養を行った。培養中、グルコースが枯渇しないように培地交換した。ゲルやペレットを、酵素処理した後トリパンブルーで細胞を計数するとともに、切片をサフラニン O により染色した。  
【結果】軟骨細胞包埋ゲルを含有した PLGA メッシュに対して重層する培地を 260  $\mu$ l から 1,800  $\mu$ l に増やすことにより、細胞によるグルコース消費速度が約 2 倍に増大し、アグリカン蓄積量も増加する傾向があることが明らかとなった。この原因は、重層培地が多い方が PLGA 分解物がゲル内に蓄積しにくいことであると考えられた。また、包埋する軟骨細胞密度を 1.0×10<sup>7</sup> cells/ml ゲルから 1.0×10<sup>8</sup> cells/ml ゲルへ上げたり、培養期間を 2 週間から 4 週間に延ばすことによっても、アグリカン蓄積量が増加する傾向が認められた。

Three-dimensional culture of porcine articular chondrocyte

Yuuki Fukui<sup>1</sup>, ○ Chikayoshi Matsuda<sup>1</sup>, Shigeyuki Wakitani<sup>2</sup>, Mutsumi Takagi<sup>1</sup>, Toshiomi Yoshida<sup>1</sup> (<sup>1</sup>ICBiotech, Osaka Univ., <sup>2</sup>Sinshu Univ.)

**Key words** chondrocyte, three-dimensional, PLGA, aggrecan

1157 ヒト神経幹細胞の大量・安定・安全培養法の開発

○原 正之<sup>1</sup>, 金村米博<sup>2</sup>, 小林 哲<sup>2</sup>, 森 英樹<sup>2</sup>, 山本篤世<sup>2</sup>, 児玉恵理<sup>2</sup>, 中西陽子<sup>2</sup>, もはめど いすらむ<sup>2</sup>, 山崎麻美<sup>3</sup>, 岡野栄之<sup>4</sup>, 三宅 淳 (<sup>1</sup>大阪府大・先端研, <sup>2</sup>テイッシュエンジニアリング研究セ, <sup>3</sup> 国立大阪病院, <sup>4</sup> 慶応大学医学部)

【目的】神経幹細胞 (NSC) を用いた中枢神経系の再生医療の実現にはヒト NSC を臨床移植用細胞としての安定供給体制の確立が必須である。我々はヒト NSC の大量・安定・安全培養法の開発に着手した。  
【方法】国立大阪病院およびテイッシュエンジニアリング研究センター医の倫理委員会承認の元、7 ～ 10 週齢のヒト中絶胎児の脳及び脊髄よりヒト NSC の分離・培養を行い、増殖速度の測定やレチノイン酸の分化誘導効果を検討した。  
【結果、考察】現在まで 12 例の提供を受け、脳及び脊髄からおのおの複数のヒト NSC の分離を行い、最長で 1 年以上の長期培養に成功している。NSC は、浮遊性の細胞塊 (neurosphere) を形成し増殖するため、細胞数の計測による増殖過程の追跡が困難である。そこで neurosphere 法にて培養をした前脳由来ヒト NSC を用いて、細胞増殖測定法として WST-8、ATP 法および BrdU 法などの各種 non-RI 法によるヒト NSC の増殖速度評価法を検討し、細胞の倍加時間 (D.T.) を求めたところ、ほぼ一致した D.T. の値が得られた。Non-RI 法を用いてヒト NSC の D.T. の簡便な評価が可能となり、今後の移植用ヒト NSC の大量培養技術開発への応用が期待される。また、齧歯類の神経幹細胞においては分化誘導時に神経細胞への分化誘導効率を上昇させることが報告されている all-trans レチノイン酸 (RA) の効果を検討した。前脳由来ヒト NSC の神経細胞生成比率は、1%FBS 単独では約 20% であったが、RA 同時投与では約 30% まで有意に増加した。現状では、基礎的研究開発を行える程度の細胞増幅が可能になりつつある。

Studies on culture method for human neural stem cell

○ Masayuki Hara, Yonehiro Kanemura, Satoshi Kobayashi, Hideki Mori, Atsuyo Yamamoto, Eri Kodama, Youko Nakanishi, Mohamed Islam, Mami Yamasaki, Hideyuki Okano, Jun Miyake (Tissue Eng. Res. Center)

**Key words** 神経幹細胞, 再生医療, 中枢神経系, 神経細胞, 脳, 脊髄

1156 3次元増殖シミュレータによる細胞集塊形成過程の解析

○原 由之, 虫明裕子, 屋敷思乃, 紀ノ岡正博, 田谷正仁 (阪大院・基礎工)

【目的】移植を前提とした 3 次元培養軟骨組織では、非破壊、無襲撃による組織形成過程の把握が困難である。患者から採取可能な細胞数の制限により、特に低い播種密度での培養における組織形成過程の解明が必要であると考えられる。そこで本研究では、3 次元培養組織内の細胞集塊形成過程の解析を目的とする。  
【方法及び結果】2.4% のアテロコラーゲンゲルにウサギ硝子軟骨細胞を種々の播種密度で接種し培養した。その結果、播種密度の低下に伴い、ゲル内の細胞集塊が大きくなることが示された。そこで、既存の 3 次元増殖シミュレータで計算を行ったところ、細胞集塊形成過程を良好に表現出来ることが分かった。一方、播種密度の差異による細胞外マトリックス生成分布についても検討を行った。集塊の大きな部分ほど高生成となり、その結果、培養軟骨組織としての品質が異なることが示された。今後、細胞集塊形成が増殖やマトリックス生成に及ぼす影響を表現するシミュレータを構築する予定である。

Evaluation of cell aggregation in cultured cartilage by three-dimensional growth model

○ Yoshiyuki Hara, Yuko Mushiaki, Shino Yashiki, Masahiro Kino-Oka, Masahito Taya (Dept. Chem. Sci. Eng., Osaka Univ.)

**Key words** tissue engineering, three-dimensional culture, cultured cartilage, chondrocytes, cell aggregation, growth model

1158 パターン化した修飾自己組織化単分子膜を利用した神経細胞培養

○仲祐貴江<sup>1</sup>, 北澤彩子<sup>2</sup>, 竹井弘之<sup>3</sup>, 清水範夫<sup>2</sup> (<sup>1</sup>東洋大院・生命, <sup>2</sup>東洋大・生命, <sup>3</sup>日立・ライフサイエンス)

【目的】マイクロ化学分析システムや再生医療工学などにおいて細胞を培養するのに使用される基板を開発するために、微細加工技術を用いて特定のパターンに表面加工した基板上で細胞や蛋白質などを固定化する技術や、基板による細胞の高次機能の制御が可能になる人工材料の開発が求められている。本研究では、金薄膜上にアルカンチオールを用いて自己組織化単分子膜 (SAM) を構築し、SAM 上で、または蛋白質で修飾した SAM 上で神経細胞を培養し、基板の安定性と細胞の長期培養が可能かどうかについて検討した。  
【方法及び結果】パターン化のために金属メッシュをシャーレにのせて金を蒸着し、金薄膜に各種アルカンチオールの SAM を形成させ、その上に神経細胞を培養し神経線維の伸長を倒立顕微鏡で観察した。また、SAM 上に数種の蛋白質を固定化し、神経細胞を培養し神経線維の伸長を観察した。その結果、SAM 上に NGF を固定化した基板において、培地に NGF を添加した場合と同様に神経細胞の固定化と神経線維の伸長が観察された。フィブロネクチンを固定した場合には多くのグリア細胞の接着が見られた。

Neurite outgrowth of neurons on patterned modified self-assembled monolayers

○ Yukie Naka<sup>1</sup>, Ayako Kitazawa<sup>1</sup>, Hiroyuki Takei<sup>2</sup>, Norio Shimizu<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Fac. Life Sci., Toyo Univ., <sup>2</sup>Life Sci. Group, Hitachi Ltd.)

**Key words** self-assembled monolayer, patterned gold surface, neuron, protein, immobilization