1K09-3 位相シフトレーザー顕微鏡を用いた接着動物細胞の非侵襲的な立体形状測定法開発

○伊藤 俊輔¹, 徳田 彰男², 藤原 政司¹, 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²エフケー光学研)

【目的】再生医療における培養細胞の品質管理には、非破壊的・非侵襲的かつ短時間で実行できる接着細胞の質的測定法が必要である。この測定手段として従来の顕微鏡観察があるが平面的形状しか得られない。これに対して、新規な原理に基づく位相シフトレーザー顕微鏡 (PLM) では観察対象点とその周囲を通過する各々の光の間の位相差を定量できることから、我々は接着細胞の立体形状測定への PLM の応用を試みてきた。今回は、位相差から細胞の厚みを算出するのに必要な細胞の屈折率測定法及びレーザーの細胞への影響について報告する。【方法】浸透圧を調節した培地 (300, 400 mOsm/L) を用いて、CHO 細胞1-15500 株を 37°C、5% CO₂ 雰囲気下で4日間静置培養した。PLM (エフケー光学研究所) により培養器視野内の位相差分布を測定した後、種々の濃度の BSA 溶液 (生理的浸透圧) を用いて細胞の屈折率を求め、屈折率データを用いて細胞の位相差分布を細胞の厚み分布に換算した。

【結果】浸透圧300 mOsm/Lで培養した細胞の厚み(最大部分)は400 mOsm/Lで培養した細胞よりも大きかった。これは原子間力顕微鏡 (AFM) による報告 (グルタルアルデヒド固定細胞使用) と同じ傾向であり、両測定法による厚み絶対値もほぼ等しかった。また、未固定の接着細胞を PLM 下に放置しレーザーを照射し続けたところ、調べた範囲内 (0~10分) では細胞の形状に変化は認められなかった。

Noninvasive analysis of three-dimensional morphology of adhesive animal cells employing phase shift laser microscope

○Syunsuke ITO¹, Akio TOKUDA², Masashi FUJIWARA¹, Mutsumi TAKAGI¹
(¹Div. Biotechnol., Grad.Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²FK Optical Lab.)

Key words diagnosis, noninvasive, three-dimension, morphology

1K09-5 細胞転写技術を用いた新規細胞パターンニング技術の開発

○高野 等覚¹, 新海 政重¹, 工藤 菜々子¹, 米山 知佳子¹, 竹澤 俊明², 長棟 輝行¹
(¹東大院・工・化生, ²農業生物資源研)

【目的】近年移植医療のドナー不足の解決策として工学的手法により組織を構築、再生させるディッシュエンジニアリングが注目されている。生体外で複雑な組織を構築するためには目的とする位置へ三次元的に細胞を配置することが重要である。このため、複数種類の細胞を効率よくパターンニングする方法が必要である。当研究室では以前より PEG-オレイルエステル (以下 BAM と示す) を用いた細胞固定化法を報告している。そこで本研究では、BAM のパターン上に細胞を固定化した後に細胞外マトリックスのシートに細胞を転写することにより、効率的にパターンニングする方法について検討を行った。【方法及び結果】BSA コートディッシュ上に BAM 溶液のパターンを作製した。ヒト正常角化細胞をこのディッシュ上に 3.0×10^5 cells/cm² となるように添加して細胞を固定化した。固定化されなかった細胞を除去した後、10%ゼラチンシートをかぶせ、約3時間後にディッシュより剥離した。その結果、細胞がゼラチンシート上に BAM パターンと同じ形で転写されることが確認された。また、培地中で2日間培養し、細胞の増殖を確認した。この結果、本手法より細胞を目的とする位置に配置することが可能であることが示された。また、ヒト正常繊維芽細胞、NIH3T3、MDCK も同様に転写が可能であることを確認した。さらに、同一ゼラチンシート上に複数種類の細胞を転写することも確認した。

Development of new cell patterning method using cell transferring printing technique

○Toshiaki TAKANO¹, Masashige SHINKAI¹, Nanako KUDO¹, Chikako YONEYAMA¹, Toshiaki TAKEZAWA², Teruyuki NAGAMUNE¹
(¹Dept. Chem. Biotech., Univ. Tokyo, ²NIAS)

Key words tissue engineering, cell patterning, extracellular matrix, keratinocyte

1K09-4 フェムト秒レーザーを利用した単一接着細胞の遺伝子発現解析

○北林 孝之¹, 上野 貢生², 三澤 弘明², 細川 陽一郎³, 増原 宏³, 脇谷 滋之⁴, 藤原 政司¹, 高木 睦¹
(¹北大院・工・生物機能, ²北大電子科学研, ³阪大院工・応用物理, ⁴大阪市大院・医・整形外)

【目的】間葉系幹細胞 (MSC) から軟骨細胞への分化培養において、細胞形態パラメーターと遺伝子発現率との対応を細胞1個単位で調べることを目指し、培養中の接着細胞の近傍にフェムト秒レーザーを照射し、そのレーザーアブレーションにより発生し伝搬する力を利用した、任意の接着細胞1個の非破壊的な回収法を検討することとした。また、回収した1細胞を対象とした定量的RT-PCR分析も試みた。【方法】分化誘導因子を添加した培地を用いて、ヒト骨髄由来MSCを接着培養した。接着細胞の近傍へフェムト秒レーザー (顕微鏡: オリンパスIX70, 対物レンズ: 20倍, 照射: 底面, 100 Hz, 1/60 sec/ショット) を照射し細胞1個を剥離すると共に、ブローラー (PC-10, NARISHIGE) を用いて回収した。

【結果】分化誘導因子無添加の培養では細胞は線維芽状のまま、アグリカンの発現はほとんど確認されなかったのに対し、分化誘導因子存在下では細胞形態が多角形様のものが多く認められた。また、レーザー出力及び照射位置としては、2 μJ/パルス、細胞から40 μm 上方が細胞剥離に適していた。

Analysis of gene expression for single adhesive cell employing femtosecond laser

○Takayuki KITABAYASHI¹, Kousei UENO², Hiroaki MISAWA², Youichirou HOSOKAWA³, Hiroshi MASUHARA³, Shigeyuki WAKITANI⁴, Masashi FUJIWARA¹, Mutsumi TAKAGI¹
(¹Div. Biotechnol., Grad.Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Res. Inst. Electr. Sci., Hokkaido Univ., ³Div. Appl. Phys., Grad.Sch. Eng., Osaka Univ., ⁴Orth. Surg., Osaka-City Univ.)

Key words laser, mesenchymal stem cell, gene expression, single cell

1K10-1 継代培養後の軟骨細胞群における分化特性の解析

○佐藤 康明, 武澤 康範, 紀ノ岡 正博, 田谷 正仁
(阪大院・基礎工)

【目的】軟骨組織培養においては、初代もしくは単層継代培養後の細胞の不均質性を許容しなければならない。この不均質性は主に3種類の表現型つまり、分化細胞 (differentiated cell), 脱分化細胞 (dedifferentiated cell), 肥大化細胞 (hypertrophic cell) から成るが、培養過程でこれら3種類の比率を非侵襲的に評価する方法は存在せず、製品の品質を保證するうえで細胞群の不均質性の評価法の確立が不可欠である。これまで、コラーゲン面 (CL 面) 上にて、軟骨細胞の形態評価は、分化細胞・脱分化細胞の判定に有効であることを示した。そこで本研究では、CL面上における肥大化細胞の分化判定への応用を試みた。【実験および結果】T-flask (PS 面) を用い、ウサギ関節軟骨細胞を単層培養し、累積分裂回数異なる不均質な細胞群を得た。これら細胞群を、本研究室で作成した高密度コラーゲン塗布面に播種して培養を行ったところ、分裂回数の増加とともに肥大化細胞のマーカであるアルカリフォスファターゼ (ALP) 活性を有する細胞の頻度が上昇した。また ALP 活性を有する細胞は偏平化していた。一方 PS 面上では同一の細胞群を用いても ALP 活性を示すことが少なく、CL面が肥大化細胞のポテンシャルを引き出していることが考えられた。そこで細胞面積と円形度を指標とする形態評価を行ったところ、分化、脱分化、肥大化細胞を判別可能であることが示唆された。

Evaluation for differentiation of passaged chondrocyte cells

○Yasuaki SATO, Yasunori TAKEZAWA, Masahiro KINO-OKA, Masahito TAYA
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words hypertrophy, chondrocyte cells, morphological change, differentiation