

2K12-5 組織認識能をもつ二酸化チタン内包リポソームの創製

○荻野 千秋, 高木 圭子, 清水 宣明
(金沢大・工・物質化学)

【緒言】二酸化チタン (TiO₂) に超音波 (U.S.) を照射することで生成するヒドロキシルラジカルによって細胞死が誘導できる (TiO₂/U.S.法)。本研究は、TiO₂ 微粒子を内包したリポソーム表面に化学修飾することで、TiO₂/U.S.法に標的認識能を持たせることを目的としている。

【実験】

凍結乾燥リン脂質をリン酸緩衝液に懸濁することによりリポソームを作製した。次に *N*-ヒドロキスクンニンイミド (NHS) で活性エステル化したポリエチレングリコール (PEG) 結合リン脂質 (NHS-PEG-DSPE) をリポソームに挿入した (NHS-PEG-liposome)。そして、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (GFP) を修飾した。

また、凍結乾燥リン脂質とポリスチレン蛍光ビーズ (粒径200 nm) をリン酸緩衝液に懸濁し、蛍光ビーズ内包リポソームも作製した。リポソーム表面に紫外光で不活性化したセンダイウイルス由来の修飾も行った。そしてウィルス修飾リポソーム (FL) をマウスリンパ腫由来細胞に作用させ、フローサイトメトリーにて蛍光ビーズ取り込み細胞の割合を測定した。

【結果】

NHS-PEG-liposomeのリン脂質 1 molに対してGFP 198 mmolを修飾できた。また未修飾のリポソームと比較して、NHS-PEG-liposomeでは約16倍量のGFPを修飾できた。

細胞培養液にFLを添加した後、フローサイトメトリーにて細胞の蛍光強度を測定した。その結果、未修飾Liposomeと比較してFLの場合有意な細胞への取り込みあるいは表面吸着が確認できた。

Synthesis and modification of fusogenic liposome encapsulated with TiO₂ nanoparticles

○Chiaki OGINO, Keiko TAKAKI, Nobuaki SHIMIZU
(Dept. Chem. Chem. Eng., Kanazawa Univ.)

Key words TiO₂, liposome, Nano-particle, drug delivery system

3K09-2 ラット臓器より作製した切片担体上で培養した2種類の細胞株の挙動比較

○柳原 佳奈¹, 竹内 朋代², 寺田 聡¹, 三木 正雄¹, 竹澤 俊明²
(¹福井大院・工,²独法生物研)

【背景および目的】生体組織の微細構造や成分を保持している「組織切片」を培養担体として利用し、異なる細胞の諸性質を解析する組織アレイ技術の確立を目指してきた。これまでに、ラットインスリノーマ細胞株RIN5Fを種々の臓器由来の切片担体上で培養したところ、細胞挙動が異なることを見出している。この成果をふまえて、同一の組織に由来する切片担体上で2種類の細胞株の挙動を比較することを目指した。異なる細胞種としてはヒト肝癌細胞株HepG2細胞に着眼した。【方法】SDラットより大脳、胸腺、心臓、腎臓、精巣および肝臓を、また、70%部分肝切除し、24時間目に再生肝臓を摘出した。各臓器を凍結後、厚さ5μmに薄切し切片担体を作製した。担体上にRIN5F細胞またはHepG2細胞をそれぞれ22万cells/cm²、4.5万cells/cm²で播種して、6日間培養した。細胞の接着と増殖はカルセインを利用して、陽性細胞の面積を測定した。また、分化機能は培養液中に分泌されるインスリンまたはアルブミン量で評価した。細胞形態は位相差顕微鏡像とHE染色像で評価した。

【結果】腎臓由来の切片上ではRIN5F細胞の接着が良好であったのに対し、HepG2細胞は接着が抑制されていた。大脳および胸腺由来の切片上では、RIN5F細胞の増殖は抑制され、HepG2細胞の増殖は促進されていた。再生肝由来の切片上では、RIN5F細胞のインスリン産生能が増強されたが、HepG2細胞のアルブミン産生能は低下した。

Cell behavior of two different cell lines on the section substrata prepared from rat organs

○Kana YANAGIHARA¹, Tomoyo TAKEUCHI², Satoshi TERADA¹, Masao MIKI¹, Toshiaki TAKEZAWA²
(¹Grad. Sch. Eng. Fukui Univ., ²Natl. Inst. Agrobio. Sci.)

Key words section substratum, tissue array, insulinoma, hepatoma

3K09-1 再生肝組織由来の切片担体を利用したES細胞の肝細胞様細胞への効率的な分化誘導

○竹内 朋代¹, 寺谷 工², 落谷 孝広², 竹澤 俊明¹
(¹独法生物研,²国立がんセンター)

【背景および目的】これまでの研究で、四塩化炭素投与4日後のマウス肝組織より作製した切片担体上でALB-ES細胞 (アルブミン発現細胞へ分化するとGFP陽性を呈するマウスES細胞)を培養すると培養24時間目までに接着した細胞の約70%がGFP陽性細胞へ分化し、細胞集団の中には約4倍に増殖したものも存在することが分かった。そこで今回は、発現ベクターをトランスフェクションしていない通常のマウス ES細胞を培養した場合でも短時間で効率よく肝細胞様細胞へ分化誘導できるか否かを検証した。【方法】四塩化炭素を投与して4日経過後のマウスより肝組織を摘出して切片担体を作製した。この上でマウスES細胞を無血清培養して上清中のアルブミン濃度を経時的に測定した。さらに、経時的に培養したES細胞について分化マーカーの発現変化を解析した。

【結果および考察】四塩化炭素投与4日後のマウス肝組織より作製した切片担体上で培養したES細胞は、敷石状に伸展して二核細胞も存在した。さらに、これらの細胞は*Eras*遺伝子の発現とアルカリフォスファターゼの活性が経時的に低下し、培養24時間目よりアルブミンの分泌も認められた。以上より、四塩化炭素による障害後の再生状態にあるマウス肝組織より作製した切片担体は、通常のES細胞も肝細胞様細胞へ分化誘導する活性を持つことが分かった。

Efficient induction of the ES cell differentiation into hepatocyte-like cells utilizing the section substrata prepared from regenerating liver tissues

○Tomoyo TAKEUCHI¹, Takumi TERATANI², Takahiro OCHIYA², Toshiaki TAKEZAWA¹
(¹Natl. Inst. Agrobio. Sci., ²Natl. Canc. Cntr.)

Key words section substratum, regenerating liver, embryonic stem cells, hepatic differentiation

3K09-3 細胞療法における自動細胞加工培養システムの実用化開発

○幡多 徳彦¹, 黒澤 尋², 紀ノ岡 正博³, 田谷 正仁³
(¹メディネット・技術開発部,²山梨大院・医工総合,³阪大院・基礎工)

細胞療法である免疫細胞療法は、患者自身の細胞を用いた自家培養によるオーダーメイド医療である。現在様々な細胞療法における細胞培養は、技術者による手作業で複数の培養容器を用いており、培養評価も技術者の経験に依存した顕微鏡観察である。そのため人件費によるコストアップやヒューマンエラーという問題点がある。また多くが自家培養である為、他患者との交雑汚染回避や、患者ごとに異なる培養特性を客観的に評価し培養プロセスを設定する必要がある。そこで本研究では、細胞療法に用いるリンパ球の自動細胞加工培養システムの開発を目的として、まず培養評価の自動化を試みた。患者より採取されたリンパ球は培養特性や状態が異なるが、このリンパ球は希少で細胞評価による損失を回避しなければいけない。そこで抗体刺激培養を非染色・非侵襲・客観的に評価する為、培養細胞観察装置を用いて継続的に細胞挙動を画像撮影し、細胞挙動解析を行った。培養面の抗体と接触した細胞は培養面を移動し細胞ドームを形成した後、培養面から遊離して細胞凝集塊を形成した。そして培養面で不均一に発生した細胞凝集塊は、培養液中を移動しながら他の細胞凝集塊と合一した。これら様々な細胞挙動は培養条件や患者ごとに異なっており、定量的に解析し評価パラメータを策定することでその後の培養における細胞増殖能の評価が可能となった。

Practical development of the automatic cell culture system for cell therapy

○Norihiko HATA¹, Hiroshi KUROSAWA², Masahiro KINO-OKA³, Masahito TAYA³
(¹Tech. Dev. Dept., MEDINET Co., ²Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamanashi, ³Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words human lymphocyte, cell behaviors, automatic evaluation system, cell therapy