

3Ba04 小容量3次元組織構築リアクターの開発

○和田 昌憲¹, 小林 準次¹, 加藤 竜司², 本多 裕之^{2,3},
石川 陽一¹

(¹エイブル株式会社, ²名大院・工・生物機能, ³名大・予防早期医療センター)

【目的】薬物代謝や毒性評価のための動物実験は、培養細胞を使った代替法への移行が進んでいる。培養細胞は3次元に組織を構築することによって始めて生体の組織に近い応答を示すことが多い。ラジアルフロー型バイオリアクターは高密度かつ均一な組織構築を可能にし、これまでに薬物代謝や毒性試験への応用の可能性を示してきた。近年、培養装置は小型化し、使い捨て可能なものが多く登場している。本研究では、薬物代謝や毒性評価の多検体試験にも使用できる小容量で扱いやすいリアクターの開発が目的である。

【方法と結果】リアクター形状は、従来のラジアルフロー型リアクターを改良・簡略化して使い捨て可能な材質で作製し、担体への培地のフローを外部から視認できるようにした。担体は1mLまで小容量化して使用培地量を大幅に削減した。HepG2細胞をPVAスponジ状担体で培養したところ、従来型のラジアルフロー型リアクターと同様に細胞密度1×108 cells/mL以上に到達し、高密度かつ均一な3次元組織を長期にわたって維持可能であることを確認した。HepG2とHUVECの共培養による擬似管腔形成、リアクターのマルチチャンネル化の検討結果も併せて報告する。

Development of mini-bioreactor for 3-D tissue culture

○Masanori WADA¹, Junji KOBAYASHI¹, Ryuji KATO²,
Hiroyuki HONDA^{2,3}, Youichi ISHIKAWA¹

(¹ABLE Corporation, ²Dept. Biotech., Grad. Sch. Eng., Nagoya Univ.,
³PME Center)

Key words bioreactor, three dimension, tissue culture,
alternative to animal experiments

**3Ba06 位相シフトレーザー顕微鏡を用いた細胞高さ測定
による接着動物細胞の非侵襲的な細胞周期推定**

伊藤 俊輔, ○高木 瞳
(北大院・工・生物機能)

【目的】我々は位相シフトレーザー顕微鏡(PLM)を用いた非侵襲的な接着動物細胞立体形状測定法をすでに確立した。そこで、PLMによる細胞高さ測定値から細胞増殖活性の指標となる細胞周期を非侵襲的に推定できないか検討した。

【方法】チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞1-15500株を静置培養し、グルタルアルデヒド4%含有PBSで固定後、PLM(レーザー波長632.8 nm、出力0.1 mW以下、エフケー光学研究所)により細胞の位相差を定量した。一方、細胞を含む培養器中の培地を種々の屈折率(1.34~1.39)のBSA、NaCl混合溶液(浸透圧300 mOsm/kg)に置換しPLMで観察し、細胞部分の位相差がほぼ0になったときの溶液の屈折率を細胞の屈折率とし、位相差定量値からの細胞高さの算出に用いた。BrdUを取り込ませたCHO細胞の位相差をPLMにより定量するとともに、DAPI染色を併用し、蛍光顕微鏡下で細胞周期を決定した。

【結果と考察】

PLMで位相差を測定したCHO細胞の細胞周期を染色により決定した結果、G2/M期にある細胞の位相差及び高さはG1/S期にある細胞と比べて約1.1 rad(44%)及び約0.29 μm(14%)有意に大きいことが示された。

Noninvasive estimation of cell cycle of adhesive animal cell by cell height determination using phase-shifting laser microscope

Shunsuke ITO, ○Mutsumi TAKAGI
(Div. Biotech. Macromol. Chem., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ.)

Key words cell cycle, noninvasive, morphology, laser

3Ba05**褥瘡創面の細胞周囲微細環境：水バランス因子としてのバーシカンの働き**

○村澤 裕介¹, 米田 雅彦², 木全 弘治³, 王 碧昭⁴, 磯貝 善蔵¹

(¹国立長寿医療センター, ²愛知県立看護大学, ³愛知医科大学, ⁴筑波大院・生命環境)

褥瘡は高齢者医療の重要な問題であるが、その創の多様性のために予防や治療の選択が難しかった。褥瘡では水環境のバランス維持が治癒に不可欠であるため、肉芽組織の水分保持と創の修復への関与が知られるヒアルロン酸と皮膚の構造マトリクスであるエラスチンとの中間での介在分子と目されるバーシカン PG-Mに着目して、褥瘡ニッチを解析した。創表面の解析ではバーシカンのヒアルロン酸結合ドメインを含んだ断片が検出できた。この断片はバーシカンのコンドロイチン硫酸結合ドメインのアルファ鎖を含むものが主であり、正常皮膚ではベータ鎖を含むものが主であることに異なっていた。さらに、我々は同一創面の特定の部位からバーシカン断片が検出できることを発見し、その臨床像と重ね合わせることに成功した。これらの方法によって創表面の細胞外マトリクスが創の臨床所見とどのように関連するかが、より理解し易くなった。褥瘡では、N末の構造切断により、HAがMF結合中のバーシカンN末から外れた後も、遊離した、先の欠けたN末がエラスチックマトリクス(ELEM)の周りを囲うことでも、HAがELEMに近づけなくなり、このことが長期間、水環境が安定しない理由となっていると推測される。

Function of versican/PG-M in granulation tissues

○Yusuke Murasawa¹, Masahiko Yoneda², Koji Kimata³,
Pi-Chao Wang⁴, Zenzo Isogai¹

(¹National Center for Geriatrics and Gerontology, ²Aichi Prefectural college of Nursing and Health, ³Aichi Medical University, ⁴Grad. Sch. Life Env. Sci., Univ. Tsukuba)

Key words extracellular matrix, geriatric medicine, wound healing

3Ba07**接着動物細胞の生死に対するレーザー照射条件の影響**

高木 陸¹, ○酒井 純¹, 上野 貢生², 三澤 弘明², 細川 陽一郎³,
増原 宏^{3,4}

(¹北大院・工・生物機能, ²北大・電子科学研, ³奈良先端大・物質創成, ⁴台湾・国立交通大)

【目的】接着動物細胞の形態的特徴を利用した非侵襲的な細胞精製技術確立のために、接着細胞の生死に対するフェムト秒レーザー照射の影響を明らかにすることを目的とした。

【方法】限界希釈法によりCHO細胞を96穴ウェルプレート1ウェルに1細胞のみ播種し1日接着後、細胞の中心又は細胞の周辺4ヶ所にフェムト秒レーザー(波長: 800 nm, 振動数: 200 Hz, 照射時間: 5.1 ms)を倍率20倍開口数0.40の対物レンズにより集光し、細胞へ照射した。さらに3~4日培養後、細胞分裂の有無を顕微鏡下で確認することで生死の評価を行った。

【結果】細胞の中心への1回のレーザー照射ではレーザー強度0.4 μJ以上で細胞が分裂能を失った。また、細胞の周囲4ヶ所への照射では、照射点と細胞との間の距離が一定長さ以上の場合で細胞が生存できること、レーザーが強いほどその限界距離が長くなることが確認できた。フェムト秒レーザーでは集光点で強い衝撃波が発生するため、集光点の近傍に発生した衝撃波による力が細胞に損傷を与えたと考えられた。

Influence of laser irradiation condition on viability of adhesive animal cells

Mutsumi TAKAGI¹, ○Jun SAKAI¹, Kosei UENO², Hiroaki MISAWA²,
Yoichiro HOSOKAWA³, Hiroshi MASUHARA^{3,4}

(¹Div. Biotechnol., Grad. Sch. Eng., Hokkaido Univ., ²Res. Inst. Electr. Sci., Hokkaido Univ., ³Grad. Sch. Mater. Sci., NAIST, ⁴Dep. Appl. Chem., Nat. Chiao Tung Univ., ROC)

Key words femtosecond, laser, adhesion, viability