

2Ga05 マイクロ灌流型スフェロイドアレイの開発

○中澤 浩二¹, 堺 裕輔¹, 杉浦 慎治², 服部 浩二², 金森 敏幸²
(¹北九大国際環境工,²産総研幹細胞工学セ)
nakazawa@env.kitakyu-u.ac.jp

【目的】細胞が集合・凝集化することによって形成する球状細胞組織体（スフェロイド）は、高機能発現を長期的に維持できる有用な培養法である。我々はこれまでに、直径が数百ミクロン単位のマイクロウェルを多数有するマイクロチップを用いて、均一なスフェロイドを大量形成・培養できるスフェロイドアレイを開発し、細胞アッセイの有望な技術となりうることを示してきた。本研究では、本チップとPDMSマイクロ流路を組み合わせたマイクロ灌流型スフェロイドアレイを新しく開発し、その有用性を評価した。
【方法】アクリル基板（26×76mm）上に64個のマイクロウェル（直径300 μm、深さ300 μm、ウェル間距離330 μm）を有する培養チャンバー（2.8×2.8mm）を16個設けたチップ基板を作製した。このチップ基板と鋳型成型したPDMSマイクロ流路を組み合わせて、マイクロ灌流型スフェロイドアレイを作製した。HepG2細胞を播種し、スフェロイドの形成状態や細胞の増殖性、さらには培養環境状態を静置培養の場合と比較した。
【結果】HepG2細胞は培養3日目までにスフェロイドを形成し、培養経過に伴ってその粒径は増大した。灌流培養におけるスフェロイド粒径の増大は静置培養よりも速く、また細胞増殖性も高かった。さらに、静置培養ではチャンバー周辺のスフェロイド粒径が顕著に増大したが、灌流培養では流れ方向に粒径の分布が見られ、これらの分布は灌流速度に依存した。これらの結果より、マイクロ灌流型スフェロイドアレイは高密度に配列するスフェロイド周辺の培養環境を改善できる培養チップであることが示された。

Development of microfluidic spheroid array

○Kohji Nakazawa¹, Yusuke Sakai¹, Shinji Sugiura², Kohji Hattori², Toshiyuki Kanamori²
(¹Dept. Life Env. Eng., The University of Kitakyushu,²RC Stem Cell Eng., AIST)

Key words Spheroid, Mirochip, Microfluidic system

2Ga07 流体力学的負荷に対する細胞応答評価ツールの基礎検討

○松永 裕樹¹, 幡多 徳彦², 野中 一洋³, 福井 康裕³, 舟久保 昭夫³
(¹電機大院・理工,²電機大・フロンティア共研セ,³電機大・理工)
11rmb38@ms.dendai.ac.jp

【目的】
現在、血管狭窄などで病んだ血管を置き換えるために人工血管が臨床現場で用い垂れている。しかしながら、埋植した人工血管の内表面に増殖する細胞の定量的評価がなされていない。そこで本研究はエレクトロスピンニング法で作製した繊維性スキャフォールドを用いて、繊維の配向性と流れ負荷によって細胞挙動に与える影響の検討・指標づくり及び、非侵襲的に人工血管の表面をモデリングし、埋植した人工血管上の細胞の評価を行うツールの開発を目的とした。
【方法および結果】
生体内力学環境を再現するためにアクリル板を用いて平行平板チャンバーの設計・開発を行った。開発したチャンバーを用いて常に流体環境下に曝されているラット胎児胸部大動脈平滑筋(A10)を流速の異なる環境で培養を行い、静置環境下と比較して挙動が異なることが確認された。また、エレクトロスピンニング法による三次元に配置した繊維性スキャフォールド上に堆積させ、流速とスキャフォールド繊維配向性が細胞に与える影響の検討を行った。これらを踏まえて人工血管表面上の細胞挙動について定量的な評価・解析を行った。

Study on the evaluation tools on cellular response to hydrodynamic load.

○Hiroki Matsunaga¹, Norihiko Hata², Kazuhiro Nonaka³, Yasuhiro Fukui³, Aikio Funakubo³
(¹Grad. Sch. Eng. Tokyo Denki Univ.,²FRDC. Tokyo Denki Univ.,³Sci.Eng.Tokyo Denki Univ.)

Key words tissue engineering, fibrous scaffold, perfusion culture

2Ga06 繊維性スキャフォールドによるハイブリッド三次元組織の開発

○幡多 徳彦¹, 村井 正広², 野口 展士³, 野中 一洋², 福井 康裕³, 舟久保 昭夫^{2,3}
(¹電機大・フロンティア共研セ,²電機大・理工,³電機大院・先科技)
n-hata@frontier.dendai.ac.jp

【背景および目的】
培養細胞を用いた三次元組織の構築では、細胞の足場となるスキャフォールドが重要な役割を果たしている。しかし組織培養において目的に合ったサイズ、形状などのスキャフォールドを細胞に構築させ制御することは非常に困難である。そこで本研究では、エレクトロスピンニング法による繊維性スキャフォールドを用いたハイブリッド三次元組織の構築を目的とし、様々なスキャフォールド構造を用いた細胞・組織培養を検討した。
【方法および結果】
医療用材料と広く使用され抗血栓性、柔軟性および高耐久性を有するセグメント化ポリウレタン（SPU）を用いてエレクトロスピンニング法により繊維性スキャフォールドを作製し、様々な構造による組織培養を試みた。三次元構造に配置したスキャフォールドに対し細胞を効率的に接着させるため、培地とパーフルオロカーボン（PFC）による二相系を用いた新たな手法を開発した。三次元に積層させたスキャフォールドでは3T3細胞およびHepG2を用いてシート様の細胞組織を作製することが可能となった。さらに組織内への培地・酸素等の供給を目的として、小口径人工血管と三次元スキャフォールドを組み合わせた構造を作製し、細胞培養することでハイブリッド型人工組織の構築についても検討を行った。

Development of the three dimensional hybrid tissue with fibrous scaffold.

○Norihiko Hata¹, Masahiro Mura², Hiroo Noguchi³, Kazuhiro Nonaka², Yasuhiro Fukui^{2,3}, Aikio Funakubo^{2,3}
(¹FRDC. Tokyo Denki Univ.,²Sci. Eng. Tokyo Denki Univ.,³Grad. Sch. Adv. Sci. Tech. Tokyo Denki Univ.)

Key words tissue engineering, fibrous scaffold, electrospinning, segmented polyurethane

2Ga09 血清と接触すると速やかに溶解する酵素架橋ヒドロゲルの開発とその応用

○境 慎司¹, 松山 智洋², 劉 楊¹, 川上 幸衛², 田谷 正仁¹
(¹阪大院・基礎工,²九大院・工・化工)
sakai@cheng.es.osaka-u.ac.jp

【緒言】生体や細胞との親和性が高いヒドロゲルは、再生医療・組織工学分野への適用が多く検討されている。研究では、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ（HRP）の酵素反応により細胞に穏和な条件下でゲル化するとともに、血清存在下において短時間で分解するゲルを形成する新たな多糖誘導体の開発ならびにその応用に関して検討を行った。
【実験結果・考察】HRPの酵素反応によりゲルを形成する新規材料を得るために、アミロペクチンとチラミン塩酸塩の混合溶液にカルボニルジイミダゾールを添加した。透析、真空凍結乾燥後にUVスペクトルを測定したところ、フェノール性水酸基が導入されたことを示す波長280 nm付近のピークが確認された。このアミロペクチン誘導体（AP-Ph）は、作製条件によってフェノール性水酸基の導入量の制御が可能であった。1 mgあたり4.3×10⁻⁹ molのチラミンに相当するフェノール性水酸基を含むAP-Phの10%(w/v)水溶液に10 units/mlとなるようにHRPを添加した溶液は、最終濃度1 mMとなるように過酸化水素を添加したところ約10秒でゲル化した。このAP-Ph水溶液から直径約0.5 mmのゲルビーズを作製し、血清を含まない培地と10%(v/v)で牛胎児血清を含む培地に浸したところ、後者においてのみ3時間後にはゲルビーズが溶解した。以上より、HRPの酵素反応により迅速にゲルを形成するとともに、血清存在下では容易に溶解するゲルの開発に成功した。このゲルは、細胞包括カプセル材料や細胞シート作製基材としても利用することができた。

Development and application of fast degradable hydrogels under the existence of serum

○Shinji Sakai¹, Tomohiro Mastuyama², Yang Liu¹, Koei Kawakami², Masahito Taya¹
(¹Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.,²Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words hydrogel, biodegradable, hydrogelation, peroxidase