

1P-256 酵素反応を利用した中空マイクロカプセルによるヒト iPS 細胞の浮遊培養

○芦田 知亮, 境 慎司, 田谷 正仁
(阪大院・基礎工)
taya@cheng.es.osaka-u.ac.jp

【目的】 ヒト iPS 細胞を用いた再生医療の普及には、大量培養技術の確立が不可欠であり、様々な試みがなされている。その中に一つに、マイクロカプセル技術があり、微小なカプセル内に細胞を内包することで、培養液中で生じる剪断力から細胞を保護しながら、培養液に懸濁させて培養が可能である。本研究では、これまでに発表者らが開発した簡単かつ短時間に作製できる中空マイクロカプセルにヒト iPS 細胞を包括し、その増殖挙動および未分化性を評価した。【方法】 アキュターゼにより単一細胞状態に分散させたヒト iPS 細胞 (201B7 株) をフェノール性尿酸基導入アルギン酸誘導体水溶液に懸濁した。この水溶液にカタラーゼおよび西洋わさび由来ペルオキシダーゼを溶解させた後、過酸化水素を溶解させた流動パラフィン中にシリンジポンプを用いて押し出すことで、ヒト iPS 細胞包括中空カプセルを調製した。カプセルに包括したヒト iPS 細胞は、フィーダーフリー無血清培地 mTeSR1 に 10 μ M Y-27632 を添加した培地にて培養を行った。【結果】 中空マイクロカプセル内に包括した直後の細胞の生存率は 90% 以上であり、細胞包括過程における細胞の生存率の顕著な低下は確認されなかった。また、細胞密度 1.0×10^7 cells/ml でカプセル内に包括した細胞は、培養日数に伴って細胞塊のサイズが増大し、培養 9 日目において直径約 100 μ m の細胞塊であった。培養したヒト iPS 細胞の未分化性をフローサイトメーターにより解析したところ、フィーダーフリー培養と同様の陽性率を維持していた。【謝辞】 本研究は、科学研究費補助金基盤研究 B (No. 24360340) の助成により行われた。

Suspension culture of human iPS cells in microcapsules prepared via enzymatic reactions

○Tomoaki Ashida, Shinji Sakai, Masahito Taya
(Grad. Sch. Eng. Sci., Osaka Univ.)

Key words human iPS cells, microcapsule, hydrogel

1P-258 抗体担持金ナノ粒子を用いた高感度アミロイドベータ凝集検出

○Tong Bu^{1,2}, Tamotsu Zako², Mizuo Maeda^{1,2}
(¹Dept. Adv. Mat. Sci., Grad. Sch. Front. Sci., Tokyo Univ.,
²Bioeng. Lab., RIKEN)
zako@riken.jp

The amyloid beta (A β) protein is a 39- to 43-amino acid polypeptide that is the primary constituent of senile plaques and cerebrovascular deposits in Alzheimer's disease (AD). This amphiphilic peptide spontaneously forms aggregates in aqueous solutions at or below physiological pH. The formation of A β aggregates, including soluble oligomer and insoluble fibrils, are considered to cause AD neuro-degeneration by affecting brain nerve cells. Therefore, detection of A β aggregates is important for early recognition of diseases. Conventional A β aggregates detections methods, such as Thioflavin T assay or Western Blotting analysis, suffer from lack of sensitivity or being labor-intensive. In this study, A β specific antibodies (Ab) were conjugated onto gold nanoparticles (AuNP) with a diameter of 40nm (Ab-AuNP). With addition of 12.5 μ M A β aggregates, the precipitation of Ab-AuNPs was observed by naked-eyes. In an aim to achieve higher sensitivity of A β aggregates detection, dark-field microscopy (DFM) was utilized to detect the A β aggregates-induced AuNPs assembly at single particle/cluster level. It is expected that this AuNP-based immunosensing method could be developed with higher sensitivity and faster than traditional detection methods.

Dark field microscopic detection of amyloid aggregates using antibody modified gold nanoparticles

○Tong Bu^{1,2}, Tamotsu Zako², Mizuo Maeda^{1,2}
(¹Dept. Adv. Mat. Sci., Grad. Sch. Front. Sci., Tokyo Univ., ²Bioeng. Lab., RIKEN)

Key words antibody, gold nanoparticle, dark field microscopy

1P-257 未分化 iPS 細胞分離に向けた免疫力学検出

○清水 桂太¹, 川村 隆三², 飯嶋 益巳³, 黒田 俊一³, 深澤 今日子⁴, 石原 一彦⁴, 中村 史^{1,2}
(¹東京農工大院・工・生命工, ²産総研・バイオメディカル,
³名大院・生命農・生命技術科学, ⁴東大院・工・マテリアル工学)
chikashi-nakamura@aist.go.jp

未分化 iPS 細胞は腫瘍形成能を有するために、分化誘導細胞群から除去する必要がある。我々の研究グループでは、AFM カンチレバー型ナノニードルに抗体を修飾し、細胞に挿入、抜去する際に得られる結合破断力の最大値 (Fishing force) を解析し、骨格タンパク質を検出する手法を開発している。本研究では、iPS 細胞で発現する中間径フィラメント、ビメンチンの検出を検討するとともに、抗体修飾方法を見直すことで、Fishing force の S/N 比を向上することを目指した。ビメンチン陽性細胞 HeLa と、ビメンチン陰性細胞 MCF-7 それぞれに抗ビメンチン抗体修飾ナノニードルを挿入し力学検出を行った。ナノニードルへの抗体修飾は、MPC ポリマーを用い、ポリマー上の NHS を介して直接抗体を固定化する従来法と、proteinA の Fc 結合能を有するナノ粒子 ZZ-BNC を経由して抗体を固定化する手法を比較検討した。その結果、いずれの修飾法でも、HeLa から平均で 3 nN 程度の Fishing force が検出された。また、陰性細胞で得られる平均値 +4SD を越える値が、10 回の挿入操作で少なくとも 1 回は検出されるという我々の定めた陽性細胞判定基準を満たすことが分かった。さらに、従来法と比較して ZZ-BNC を用いた場合では、S/N 比が 2 倍程度向上することが見出された。

Vimentin detection from undifferentiated iPS cells using antibody-functionalized nanoneedle

○Keita Shimizu¹, Ryuzo Kawamura², Masumi Iijima³, Shun'ichi Kuroda³, Kyoko Fukazawa⁴, Kazuhiko Ishihara⁴, Chikashi Nakamura^{1,2}
(¹Dept. Biotechnol. Life Sci., TUAT, ²Biomedical Res. Inst., AIST, ³Dept. Bioagric. Sci., NU, ⁴Dept. Mat. Eng., UT)

Key words antibody, nanoneedle, intermediate filament, iPS cell

1P-259 Gold Nanoparticles (Au NPs): On the way of different Synthetic Routes

○Syed Rahin Ahmed, Enoch Y. Park
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)
acypark@ipc.shizuoka.ac.jp

Gold Nanoparticles (Au NPs) has aroused intense research interest in nanotechnology owing to its unusual physical and chemical properties and many technological applications such as chemical or biosensors, bioimaging, photonics, surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), Solar cell designs. We have developed thirteen synthesis methods of gold nanoparticles with different shapes. Gold nanoparticle formation was found from tetrachloroaurate(III) in the presence of nine Good's Buffers which are used widely in laboratories for studies of analytical, inorganic, physical, and biochemistry as well as biology. The obtained gold nanoparticles were examined by Ultraviolet-Visible Spectroscopy (UV-vis), Dynamic Light Scattering (DLS) and by transmission electron microscopy (TEM) for particle morphologies. The investigation also involved the stability of Au NPs at different pH and cytotoxicity in different cells.

Gold Nanoparticles (Au NPs): On the way of different Synthetic Routes

○Syed Rahin Ahmed, Enoch Y. Park
(Grad. Sch. Sci. Technol. Shizuoka Univ.)

Key words gold colloid, Goods buffer, Cytotoxicity, stability