

2P-173 3D perfusion culture through patterned photodegradable hydrogel in PDMS microfluidic device

Yanagawa Fumiki, ○Sugiura Shinji, Takagi Toshiyuki, Sumaru Kimio, Kanamori Toshiyuki
(AIST, Stem Cell Eng. Res. Ctr.)
shinji.sugiura@aist.go.jp

Recently, we reported an activated-ester-type photocleavable crosslinker, NHS-PC-4armPEG, which is convenient material to prepare photodegradable hydrogels through simple two-component mixing reaction using a biocompatible polymer containing amino moieties such as gelatin. In this study, we applied this gelatin-based photodegradable hydrogels to construct biomimetic 3D liver tissue in a microfluidics device with a manner of photolithography. This platform enabled microscale fabrication of perfusable tissues with designed geometry in a microfluidic device. A microfluidic device was fabricated out of PDMS by soft lithography. The culture medium was perfused into the assembled device by a pressure control system. After encapsulation of HepG2 cells in the hydrogels, the samples were exposed to patterned light using a mask-free irradiation system. The hydrogels in the irradiated area were completely degraded after incubation, and patterned hydrogels were successfully prepared on the PDMS lid. The light irradiation and hydrogel degradation did not alter cell viability in the unexposed regions during this process as shown by live/dead test. To assess the ability to perform 3D perfusion culture, the patterned hydrogels on the PDMS lid was loaded into the assembled microfluidics device. The hydrogels with different geometry was successfully loaded into the PDMS perfusion culture device and homogeneous medium flow through the patterned hydrogels was observed.

3D perfusion culture through patterned photodegradable hydrogel in PDMS microfluidic device

Yanagawa Fumiki, ○Sugiura Shinji, Takagi Toshiyuki, Sumaru Kimio, Kanamori Toshiyuki
(AIST, Stem Cell Eng. Res. Ctr.)

Key words tissue engineering, microfluidic device, three dimension, gelation

2P-175 フルオレセインによるアルブミンフィルムの細胞接着性調節

○飯田 温子, 谷口 幸大, 立花 亮, 田辺 利住
(阪市大院・工・化生系)
tanabe@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【緒言】

細胞パターンニングは薬剤スクリーニングや再生医療の基礎技術として、細胞間相互作用の研究に用いられる。安価で簡単にパターンニングを行うため、我々はアルブミンを架橋し、不溶性かつ細胞非接着性のアルブミンフィルムを作製した。今回、アルブミンフィルムにフルオレセイン溶液を滴下し、ブルーライトを照射すると、フルオレセイン滴下部が細胞接着性に変化するという知見を得たので報告する。

【方法・結果】

アルブミン溶液にEGDEを加え、架橋アルブミン溶液を作製した。溶液をディッシュにキャストして一晩風乾し、アルブミンフィルムを作製した。フィルムに細胞接着性が出ない10分間程度のUV照射を行った後、濃度を変化させたフルオレセイン溶液を滴下した。滴下後、フルオレセインの吸収波長を含むブルーライトを照射した。L929細胞を播種し、24時間後に観察した。フルオレセイン濃度が0.05~1 mg/mLで滴下部が細胞接着性に変化した。0.075~1 mg/mLの濃度では、UV照射なしでも細胞接着性が得られた。フルオレセインを固定化するためFITCを用いても同様の結果が得られた。FITCを用いフィルム全体にフルオレセインを固定化し、ブルーライトを部分照射すると、照射部分だけが細胞接着性に変化した。以上のように、フルオレセインとブルーライトを組み合わせた新しい細胞パターンニング法を開発した。

Control of cell-adhesiveness of albumin film using fluorescein

○Atsuko Iida, Yukihiro Taniguchi, Akira Tachibana, Toshizumi Tanabe
(Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words cell patterning, albumin, fluorescein

2P-174 ヘリウムプラズマジェットによるアルブミンフィルムの細胞接着性変換

○岩村 真実¹, 多賀 陵佑², 白藤 立², 立花 亮¹, 田辺 利住¹
(¹阪市大院・工・化生系, ²阪市大院・工・電情系)
tanabe@bioa.eng.osaka-cu.ac.jp

【緒言】

生体適合性や汎用性の高いアルブミンを用いて作製した細胞非接着性のアルブミンフィルムにUVを照射すると細胞接着性表面へと変換できることがわかっている。今回は、組織培養用ディッシュの表面処理などにも用いられるプラズマに注目し、アルブミン表面にプラズマ処理を行うことで細胞接着表面への変換を試みた。高価なフォトマスクを使わず、パターンを制御しやすいプラズマジェットを照射することで、より簡便で安価な細胞パターンニングにつながる技術を見つけるため研究を行った。

【方法・結果】

アルブミン溶液に架橋剤EGDEを加え、架橋アルブミン溶液を作製した。これを35 mmの無処理ディッシュにキャストして一晩風乾し、アルブミンフィルムを作製した。ヘリウムプラズマジェットをフィルムに照射し、エタノール処理およびPBSによる洗浄をした後L929細胞を播種し観察を行った。ガラス管の口径、ヘリウムガスにかかる電圧、ガスの流量、噴射口からフィルムまでの距離、照射時間を変えて実験を行ったところ、一定条件下でアルブミンフィルムが細胞接着性に変換されることがわかった。ヘリウムにかかる電圧を高くすると、それに伴い細胞接着数が増加し細胞も伸展した。ヘリウム流量は細胞の接着範囲に影響を及ぼした。ガラス管を加工し噴射口を絞ると、接着範囲を狭めることができた。また接触角測定により、プラズマ照射を行った表面は親水性表面へと変換することがわかった。

Conversion of cell adhesiveness of albumin film by helium plasma jet

○Mami Iwamura¹, Ryosuke Taga², Tatsuru Shirafuji², Akira Tachibana¹, Toshizumi Tanabe¹
(¹Dept. Appl. Chem. Bioeng., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ., ²Dept. Phys. Elec. Info., Grad. Sch. Eng., Osaka City Univ.)

Key words albumin production, cell adhesiveness, plasma jet

2P-176 細胞培養基材への利用に向けた羊毛ケラチンハイドロゲルの特性解析

○尾崎 由季, 高木 優輔, 森 英樹, 原 正之
(阪市大院・理・生物科学)
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【緒言】ケラチン(keratin)は上皮系細胞の角質化による産物で、毛髪など動物体の表層部を保護する役割を果たす組織の主成分となる線維性蛋白質である。これら角質化組織はシステイン残基が多くジスルフィド結合(-S-S-)を形成していることにより物理的、化学的に安定である。本研究では、蛋白質変性剤のguanidineと-S-S-切断剤の2-mercaptoethanol(2-ME)を用いて羊毛より抽出し調製したケラチン由来ハイドロゲルについて、細胞培養基材としての特性を評価した。

【方法・結果】ヒツジ(*Ovis aries*)の体毛を8 M guanidine 塩酸塩と1.66 M 2-MEを含む溶解液で60℃で18h抽出し、ケラチン粗抽出液を得た。この溶液を純水に対し透析することで可溶性ケラチン蛋白質が自己凝集・再架橋しハイドロゲルが得られる。透析装置を工夫する事で、円盤状のゲルを調製し動的粘弾性測定と引っ張り試験を行った。走査型電子顕微鏡(SEM)で観察すると、上記のケラチンハイドロゲルは連結粒子状の多孔質構造を持っており、また粘弾性測定の結果、貯蔵弾性率(G')40 kPa、ヤング率120 kPa程度の、高い力学的強度を有していた。さらに、細胞培養基材としての適性を評価するためマウス胎仔線維芽細胞(MEF)、ラット褐色腫由来PC12細胞、ヒト骨肉腫由来HOS細胞、の3種類の接着性細胞をゲル上に播種し培養した。3種の細胞はゲル表面に接着し良く増殖することが明らかになった。今回我々が示した方法では、羊毛ケラチンを材料とし簡便な方法により、力学的強度の高い多孔質の3次元細胞培養基材を調製することが可能であるため、今後の組織工学における利用が期待される。

Characterization of Wool Keratin Hydrogel as Scaffold for Cell Culture

○Yuki Ozaki, Yusuke Takagi, Hideki Mori, Masayuki Hara
(Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words keratin, wool, scaffold, biomaterial