

3P-229 膜ダイナミクス解析に基づく界面活性剤の刺激性評価

○下川 真司, 下川 直史, 辻野 義雄, 高木 昌宏
(北陸先端大・マテリアル)
s1430038@jaist.ac.jp

【背景】界面活性剤の刺激性評価法の一つとして、動物の眼に点眼し炎症度合いを測るドレイズ試験法があるが、誤差や動物愛護の観点から問題があり、代替法の開発が望まれている。本研究の目的は、リン脂質のみで構成される人工細胞膜・リボソームの形態変化を観察する事で、簡単に定量性の高い界面活性剤の新しい刺激性評価法の確立と、皮膚刺激性発生メカニズムの解析を行うことである。

【方法】リボソームは不飽和リン脂質 DOPC を用い静置水和法にて作成し、蛍光プローブとして Rhodamine-DHPE を使用した。両性・陰イオン性・アミノ酸系界面活性剤を添加し、共焦点レーザー顕微鏡により、リボソームの形態変化を観察した。映像の解析を行い、膜形態変化と界面活性剤の刺激性との関連を調べた。

【結果・考察】高刺激性界面活性剤の TritonX-100 をリボソームに添加した場合は余剰表面積が増加した後、膜の末端から可溶化していった。一方、低刺激性界面活性剤 Tween20 を添加した場合はリボソームが収縮した後、膜同士が小さな小胞を形成していき、可溶化まで長い時間を要した。陰イオン性界面活性剤を添加した場合は、リボソームが収縮した後、様々な形態変化を起こした。ドレイズ試験では“最小の刺激”として同刺激区分に属するアミノ酸系の界面活性剤であっても、形態変化の差から、刺激性に差があることがわかった。これらの形態変化を、界面活性剤の濃度比に従って順位付けることにより、刺激性評価法の開発と刺激発生メカニズム解析の可能性が示唆された。

Evaluation of irritation by surfactants based on membrane dynamics

○Shinji Shimokawa, Naofumi Shimokawa, Yoshio Tsujino, Masahiro Takagi
(Sch. Mater. Sci., JAIST)

Key words surfactant, liposome, membrane dynamics, skin irritation

3P-230 脳毛細血管内皮細胞の細胞形態解析によるカドミウムイオンの毒性評価

○横田 恵, 森 英樹, 原 正之
(阪府大院・理・生物学科)
hara@b.s.osakafu-u.ac.jp

【背景と目的】脳毛細血管内皮細胞は薬物透過性や細胞毒性評価に用いられる。カドミウムイオン(Cd²⁺)は腎臓・肝臓・骨組織に障害を引き起こすだけでなく、血管系疾患のリスクを高め、また血管内皮細胞に対して濃度に依存して異なる細胞毒性を示す事が知られている。本研究では、細胞の形態に基づく毒性評価方法の開発を目指し、脳毛細血管内皮細胞を用いて Cd²⁺曝露後の脳毛細血管内皮細胞の生死判別試験と形態の解析を行った。

【方法と結果】実験にはマウス脳毛細血管内皮細胞株である bEnd.3 細胞を用いた。細胞密度 5.0×10⁴ cells/ml で播種し、10%ウシ胎仔血清含有の DMEM(HG)を用いて 37℃、5%CO₂ で 3 日間培養した。CdCl₂ 溶液(0.002 ~ 1 mM)を添加し 24 時間後、WST 法による細胞生存率試験を行ったところ、細胞半数阻害濃度 IC₅₀ 値は 0.08 mM であった。その結果をもとに 0.01 mM 及び 0.2 mM の CdCl₂ に曝露した細胞の顕微鏡画像をインキュベーター中で継続的に撮影し、また Calcein-AM / Propidium Iodide(PI)を用いた live/dead 染色によって細胞の生死判別を行った。顕微鏡画像から、0.01 mM Cd²⁺存在下では、約 73 時間かけて、細胞間の境界線が不明瞭になり、やがて小さく収縮するように剥がれていく特徴が見られたが、0.2 mM では、約 10 時間かけて、形態が比較的保持されたまま剥がれていく特徴が見られた。また染色結果からディッシュから剥がれた細胞が PI 陽性であることが確認でき、Cd²⁺による細胞形態変化の差異から細胞毒性検出へ応用できる可能性が示唆された。

Cytotoxicity of cadmium ion on mouse brain capillary endothelial cells evaluated from the cellular morphology

○Megumi Yokota, Hideki Mori, Masayuki Hara
(Dept. Biol. Sci., Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ)

Key words brain capillary endothelial cell, cadmium, cell death, cytotoxicity

3P-231 紫外線照射コラーゲンゲルに対する脳毛細血管内皮細胞の接着性の解析

○森 英樹, 佐藤 綾香, 原 正之
(阪府大院・理)
morihide@b.s.osakafu-u.ac.jp

【背景・目的】脳毛細血管内皮細胞は血液から脳組織内への物質透過を調節する血液脳関門としての役割を担っている。脳毛細血管内皮細胞株 bEnd.3 細胞は血液脳関門モデル細胞として薬剤の透過性試験や毒性試験に用いられてきた。本研究はコラーゲンゲルの表面を紫外線照射により部分的に改質し、bEnd.3 細胞の接着性を変化させ、細胞のパターン化技術へ応用することを目的としている。

【方法】希塩酸に溶けた 0.6%コラーゲン溶液を中和し、線維化コラーゲンゲルを作製した。線維化コラーゲンゲルに紫外線を 0-60 分間照射したものを実験に用いた。紫外線照射によるコラーゲンゲル内の分子間の架橋の程度を SDS-PAGE や乾燥後の重量測定によって評価した。また、コラーゲンゲル表面の形状を AFM で観察した。さらに、コラーゲンゲル上への bEnd.3 細胞の接着、増殖性を比較するために、bEnd.3 細胞を各々のゲル上へ播種し、培養 0~7 日後の細胞の顕微鏡写真を撮影し、比較した。

【結果】線維化コラーゲンゲルは 15 分間の紫外線照射で界面活性剤でも全て可溶化できないほどに架橋した。コラーゲンゲルの表面は紫外線照射後のコラーゲンゲルでも線維構造を保持していた。bEnd.3 細胞はすべてのコラーゲンゲルへ接着したが、未照射のコラーゲンゲルに比べて紫外線を照射したゲル上へはより多くの bEnd.3 細胞が接着し、伸展した。

Analysis of adhesion properties of brain capillary endothelial cells on UV-irradiated collagen gels

○Hideki Mori, Ayaka Sato, Masayuki Hara
(Grad. Sch. Sci., Osaka Pref. Univ.)

Key words collagen, ultraviolet light, brain capillary endothelial cell, patterning

3P-232 選択的な細胞接着・分離技術の開発

○榎本 詢子, 福田 淳二
(横国大院・工)
fukuda@ynu.ac.jp

【目的】様々な細胞の懸濁液の中から特定の細胞を分離、濃縮、回収できる技術は、再生医療やがん研究、創薬などいくつかの分野において有用である。本研究では、特定の細胞をアプタマーの選択性を利用して基板上に接着させ、その後、電気化学的反応を利用して非侵襲的に回収する技術の確立に取り組んだ。

【方法】独自に設計したオリゴペプチドの自己組織化単分子膜を金表面上に形成させ、この末端に肝細胞と特異的に結合するアプタマーを結合させた。この基板上に肝細胞と線維芽細胞を播種し、細胞選択性を評価した。そして、接着した細胞を、金基板に -1.0 V (vs. Ag/AgCl) を 5 分間印加し、自己組織化単分子膜を脱離させることで脱離・回収した。

【結果・考察】オリゴペプチド自己組織化単分子膜のみでは、細胞が全く接着しないことを確認した。そして、ここにアプタマーを修飾したところ、肝細胞が 85%の選択性で接着した。さらに、電圧印加により、接着したすべての細胞を回収可能であることが示された。さらに、この操作を繰り返すことで、肝細胞の濃縮が可能であることが示された。よって、アプタマーを利用した分離濃縮システムの開発に向けた基盤技術を確立することができた。

Catch-and-release of target cells based on electrochemical cell detachment

○Junko Enomoto, Fukuda Junji
(Grad. Sch. Eng., Yokohama Natl. Univ.)

Key words Self-assembled peptide, Aptamer, Electrochemical cell detachment