

2P-2094 ナノニードルの多数回挿入による細胞障害の解析

○諸岡 千佳¹, 三枝 真吾¹, 雨宮 陽介¹, 中村 徳幸^{1,2},
中村 史^{1,3}
(¹東京農工大・工・生命工,²産総研・健康工学研究部門,³
産総研・バイオメディカル研究部門)

我々の研究グループでは、ナノニードルを用いた細胞挿入操作技術の開発を行っている。ナノニードルは集束イオンビーム加工により単結晶シリコン製のAFMカンチレバーの先端を直径200 nmの円柱型に加工したものである。これまでにナノニードルを細胞に1時間以上挿入し続けても細胞のバイアピリティに顕著な変化は見られないこと、またナノニードルの挿入前後でイオンの流入も観察されないことを確認している。ナノニードルを用いた細胞解析において、1個の細胞に対して挿入箇所を変えて10回以上の挿入操作を行う場合もあるが、多数回の挿入が細胞の生物活性に与える影響は明らかにされていない。

本発表ではマウス胚性腫瘍細胞P19を用いて、ナノニードルを多数回挿入した場合の細胞への障害について評価を行うことを目的とした。1個のP19に対して、挿入箇所を変え10カ所に挿入操作を行い、それぞれの挿入箇所ですべて1、5、10回、総回数10、50、100回の挿入操作を行った。その後、細胞分裂を観察し倍加時間を評価した。その結果、総回数10回の場合は、挿入操作を行わなかった場合と比べて倍加時間に差違が確認されなかった。これに対して総回数50、100回の場合は倍加時間の延長が認められたが、分裂を停止した細胞は観察されなかった。

Analysis of cell damage caused by a number of insertions of nanoneedle

○Chika MOROOKA¹, Shingo MIEDA¹, Yosuke AMEMIYA¹,
Noriyuki NAKAMURA^{1,2}, Chikashi NAKAMURA^{1,3}
(¹Dept. Biotechnol., Tokyo Univ. Agric. Technol.,²Health Research Institute,
AIST,³Biomedical Research Institute, Univ. Yamaguchi)

Key words AFM, cell manipulation, nanoneedle insertion, cell damage

2P-2096 マイクロ流路を用いた異方的アルギン酸ファイバーの作製と細胞の成長方向制御

○山田 真澄, 長沼 洋次, 菅谷 紗里, 関 実
(千葉大院・工・共生応用化学)

【緒言】ファイバー状のハイドロゲル材料は、細胞の高密度培養のための基材や、組織工学のためのスキャフォールド、バイオリアクターのための固定化担体などとして有用である。均一な成分のアルギン酸カルシウム等のハイドロゲルファイバーは、通常は微小なノズルや2重管を利用して作製されている。本研究では、細胞の成長方向の制御を可能とするより高機能なハイドロゲルファイバー作製のために、マイクロ流体デバイスを用いた新規作製法を提案した。そして、断面が物理的強度の異なる複数の成分によって構成されるアルギン酸ハイドロゲルファイバーを作製し、その内部において細胞の成長方向の制御を試みた。

【実験及び結果】微細加工技術を用いて、複数の入口流路が合流するPDMS製流路構造を作製した。外側の入口から順に、カルシウム溶液、緩衝液、アルギン酸ナトリウム水溶液を導入したところ、連続的なハイドロゲルファイバーの作製が可能であり、その直径は10~200ミクロン程度の範囲で調節可能であった。また、アルギン酸溶液の導入口を複数設け、アルギン酸エステルの濃度の異なる水溶液を導入することで、柔らかい部分が硬い部分に挟まれたコアシェルファイバーを作製し、さらに、細胞をコア部分に埋め込み培養を試みたところ、NIH 3T3・HeLa等の培養細胞は、コア部分に沿って線形のコロニーを形成しながら増殖することが確認された。本研究で作製したアルギン酸ファイバーは、マイクロメートルオーダーで正確にその異方性が制御できるため、高機能バイオマテリアルとしての利用が期待される。

Microfluidic fabrication of anisotropic alginate hydrogel fibers for guided cell growth

○Masumi YAMADA, Yoji NAGANUMA, Sari SUGAYA, Minoru SEKI
(Dept. Appl. Chem. & Biotech., Chiba Univ.)

Key words alginate, microfluidic device, tissue engineering, fiber

2P-2095 ハンギングドロップ法による胚様体形成における初期細胞数がマウス ES 細胞分化に及ぼす影響

○大貫 喜嗣, 黒澤 尋
(山梨大院・医工総合・生命)

【目的】胚様体 (EB) は、ES細胞のin vitro分化誘導システムとして広く用いられている。EBの形成にはハンギングドロップ法 (HD法) が広く用いられているが、ドロップ当たりの初期細胞数は20~1000 cells/dropであり、ドロップの培地容積も15~50 μ lと定まっていなかった。我々は、EBの質 (分化状態) を一定の範囲に収めることが、その後の目的細胞の分化誘導を安定的に進める上で重要であると考え、HD法における初期細胞数がEBの分化状態にどのような影響を与えるかを検討した。

【方法】マウスES細胞 (129sv) の初期播種濃度が、1000, 500, 250, 100 cells/50 μ L-dropとなるように100mmシャーレのフタに懸滴を作製し、HD法で5~7日間の培養を行いEBを形成した。比較対照として、細胞非接着性のU底96-wellプレート (96-well法) を用いて、1000, 500, 250, 100 cells/wellとなるように細胞を播種しEBを形成した。形成されたEBの遺伝子発現をRT-PCRにより解析した。

【結果及び考察】HD法ではEBの培養は5日間で限界で、5日目から7日目にかけてはEBの生育が十分にサポートされなかった。それは、初期細胞数が多くなるほど顕著であった。5日目のEBでは、初期細胞数が多いほど、分化が進む傾向が見られた。この傾向は96-well法の結果と一致していた。しかし、HD法では1000 cells/dropで形成したEBの分化能は不安定で、1000 cells/dropはHD法では細胞過多の条件であることが示唆された。このことから、EB形成に関わる初期細胞数の重要性が改めて確認された。

Effect of initial cell number of mouse ES cell on EB formation in hanging drop method

○Yoshitsugu OHNUKI, Hiroshi KUROSAWA
(Dept. Biotech., Grad. Sch. Med. Eng., Univ. Yamaguchi)

Key words ES cell, embryo body, differentiation

2P-2097 逐次遺伝子組み込みシステムのための変異 loxP 配列のスクリーニング

○亀山 雄二郎, 榎坪 寛勝, 黄 碩豪, 河邊 佳典, 井藤 彰,
上平 正道
(九大院・工・化工)

【背景・目的】組換え動物細胞を用いてバイオ医薬品などの有用物質を生産する際、生産性の高い細胞株を樹立するために、薬剤耐性遺伝子等の選択マーカーを利用して、目的遺伝子のコピー数を染色体上で増幅させる方法が用いられている。しかし、この方法は、低効率であるとともに、導入部位がランダムであるために発現抑制を受ける場合もある。我々はこれまでに、細胞染色体上でCreリコンビナーゼを用いてloxPターゲットサイトへ複数の目的遺伝子を逐次的に組み込むことができるシステムを開発した。本研究では、高効率な逐次遺伝子導入を達成するために、反応効率の高い変異loxP配列の選抜を試みた。

【実験方法・結果】変異loxP配列のCreによる反応効率を評価するために、開始コドンを上流に含む変異loxP配列をプロモーター下流に配置したアクセプタープラスミド、および変異loxP配列下流に開始コドンが欠損したGFP遺伝子を有するドナープラスミドを作製した。Cre反応によりこれら2つのプラスミドの変異loxP間で組換えが起きたときのみ、GFPの発現が確認できるようになっている。作製したプラスミドをCre発現CHO細胞に導入後、FACSでGFP陽性細胞数を解析したところ、Creによる反応効率は変異loxP配列の種類に依存していることが分かった。また、これまで用いていた変異loxP配列より反応効率が高い配列を選抜され、その中には異種の組み合わせでは反応しないものがあった。これらから、選抜した変異loxP配列は逐次組み込みシステムに用いることができると考えられる。

Screening of mutant loxP sequence for accumulative gene integration system

○Yujiro KAMEYAMA, Hirokatsu MAKITSUBO, Shuohao HUANG,
Yoshinori KAWABE, Akira ITO, Masamichi KAMIHARA
(Dept. Chem. Eng., Fac. Eng., Kyushu Univ.)

Key words gene amplification, Cre-loxP, site-specific integration, accumulative gene integration