2P313

興奮性・非興奮性細胞を用いた心筋細胞の拍動同期制御

○金子 智行、小島 健介、鈴木 郁郎、安田 賢二（東大院・総合文化）

新生ラットの心筋細胞は自動能を有しており、自立的に拍動することが知られている。これら自動能を有している心筋細胞群間に繊維芽細胞などの非興奮性細胞群を配置したところ、コネキシン 43(Cx43)等からなるギャップジャンクションを通して電気的興奮が伝播し、心筋細胞群間の拍動が同期する現象が確認された。しかし、これは細胞群での現象であり、一細胞単位で制御されたものではなかった。そこで、我々は孤立化した心筋細胞の拍動同期を非興奮性細胞である繊維芽細胞や HeLa 細胞と接続させたり、興奮性細胞であるラット神経細胞と接続させたりすることで実現し、拍動の同期を一細胞単位で制御することを試みた。

当研究室で開発されたアガロースマイクロチャンバーを用いて、孤立化した心筋細胞を繊維芽細胞や、Cx43 を導入した HeLa 細胞で架橋する (図) ことにより心筋細胞の拍動が同期する現象を確認した。心筋細胞間に 2 つの HeLa 細胞を配置した場合は心筋細胞の拍動同期が起りにくかったのに対し、Cx43 を導入した HeLa 細胞では両端の心筋細胞の拍動が同期した。さらに、興奮性細胞である神経細胞を心筋細胞間に配置し、拍動の同期や電気的興奮の伝播について検討する予定である。

T. Kaneko, K. Kojima, I. Suzuki and K. Yasuda : Control of the synchronization of the beating in the cardiac myocytes by excitable or nonexcitable cells

2P315

培養細胞の形態制御法としてのアガロースゲル微細加工技術の開発

○森口 裕之、服部 明弘、金子 智行、安田 賢二（東大院・総合文化・生命環境）

【目的】多細胞生物は異なる役割を持った多種類の細胞が集合したシステムであり、細胞から個体に至る各々の階層で生物体が生ずる形状や空間配置は、多細胞生物の機能を表現した重要な生命の構成要素であると考えられる。しかし、実際にその構成の意味を理解するための方法論は未だ発展途上にある。この観点から我々は培養細胞の空間配置制御技術の開発と応用を試みてきた。本研究では多くの細胞種に対し非活性で加熱による融解除去ができるという特長を持つアガロースゲルを材料とする微細加工技術について微細加工技術と細胞操作技術としての両面から検討を行ったのでこれについて報告する。

【方法】1) 水の吸収のない波長 1064 nm の集束レーザー光とクロムの吸光層を使用してアガロースを局所溶解する Photo-thermal Etching (PTE)、2) 水に吸収のある波長 1480 nm の集束レーザー光を使用する PTE、3) 1064 nm レーザー光と吸光層を先端に付加したマイクロニードルを使用し、この先端で局所的にアガロースを溶解する Photo-thermal Microneedle Etching (PTMNE)、の 3 種類のアガロースゲル微細加工法について、共焦点顕微鏡を用いた 3 次元構造観察などにより加工精度や作製可能な形状の範囲を比較・評価した。また作製した微細構造中の培養細胞の経時観察により形状制御能を評価した。

【結果】PTE・PTMNE によって 1) 大掛りな微細加工用設備なしで顕微鏡ステージ上で μm 精度の微細加工ができ、2) 生理的条件下で培養中追加加工による微細構造の変更操作が可能であることが確認できた。PTE では 2 次元的配置のみであったが、PTMNE では 3 次元的配置を持った微細構造の作製に使用できることが確認できた。詳細については、本会にて報告する。

H. Moriguchi, A. Hattori, T. Kaneko and K. Yasuda : Development of agarose-gel microfabrication techniques as methods for morphological control of cultured cells

2P314

アガロース薄層に固定したマイクロビーズ上での細胞培養と選択的細胞回収技術の開発

○安西 悠、森口 裕之、服部 明弘、金子 智行、安田 賢二（東大院・総合文化）

人工細胞培養基材の開発は再生医療への応用を中心に広く行われている。特に幹細胞の体外増殖については、その支持細胞として、感染症などが懸念される異種動物由来の細胞が多く用いられてきた。それらの支持細胞に替わる培養基材も次々に開発されているが、培養した細胞をいかに回収するかという問題を同時に解決できる手法はまだまだ開発されていない。そこで我々は新しい細胞培養法の一つとして、アガロース薄層に部分的に埋め込むことで固定した基質修飾マイクロビーズ層上で細胞を培養し、その後集束レーザー光によってアガロース層を溶解・拡散させ、自由になったマイクロビーズと細胞をマイクロベットのによって吸引して回収する技術を開発し、その技術の評価を行った。本技術の特長は、生理活性分子で修飾されたマイクロビーズを単層で配置することで支持細胞に替わる培養基材となる点、またマイクロビーズ上で培養した細胞を、集束レーザー光を用いた局所過熱によりアガロースを部分的に融解させることで、その部位の細胞を選択的にかつ非侵襲的に剥離、回収することができる点である。本実験では、まずクロムを蒸着したガラス基板上にスピンコートによってアガロース薄層を形成し、その上にマイクロビーズを単層で配置した。そして集束レーザー光（波長 1064nm）を用いてその出力とマイクロビーズの剥離面積との関係を定量的に計測し、その線形性を確認した。次にマイクロビーズ上で培養した細胞を選択的にかつ非侵襲的に回収するために、神経成長因子 (NGF) 処理により神経様突起を伸長する PC12 細胞を用いて、単層マイクロビーズ上で細胞が増殖することを確認し、さらに集束加熱が与えるダメージを検討するため、培養中の PC12 細胞を集束レーザー光を用いて選択的に回収し培養したところ増殖、分化することを確認した。詳しくは本会にて報告する。

Y. Anzai, H. Moriguchi, A. Hattori, T. Kaneko, K. Yasuda : Cell Culture and purification of the selected cells on close-packed microsphere monolayer

2P316

微細流路での層流現象と遠心力を利用した細胞環境置換法の開発

○折田 一樹、服部 明弘、安田 賢二（東大院・総合文化）

【目的】細胞の培地成分を瞬時に交換する操作が実現できれば、細胞への外界からの刺激と、それに対する細胞内の応答観察をより高精度に行うことが可能となる。そこで我々は培地を瞬時に交換するための 1 細胞レベルのマイクロ流体システムを開発し評価した。

【方法】微小な流路中ではレイノルズ数の関係から粘性の影響が大きく流れの方向がそろった層流が容易に形成される。この層流 2 つを平行に接触させた際に 2 つの層流が境界を維持し混合しない現象を利用し、この接触部で細胞を片方の層流からもう一方へ重力や遠心力を用いて移動させることで細胞の培地環境を瞬時に置換する装置を開発した。図 1 は装置の模式図である。2 重の U 字型の流路を持つチップには、一方に細胞を含む培地を、他方に置換したい培地を流し、2 液を U 字の底の一部で接触させた。さらに層流の接触面に垂直に重力・遠心力をかけ、層流間を細胞が移動するようにした。

【結果・考察】特別の観察系を設け、重力・遠心力による層流間での細胞の移動を高速カメラによって確認した。さらに還流液の密度を調節し特定の密度の細胞を取り出す試みも行っている。結果の詳細、考察については本年会にて報告する。

図1: チップの概略図

K. Orita, A. Hattori and K. Yasuda : Development of the single-cell-based high-speed buffer exchange method using laminar flow in microfluidic pathways and centrifugal force.