

3H09-3 ラット初代肝細胞の機能維持に優れた新しいゲル
薄膜サンドイッチ培養法

○中沢 有紀子^{1,2}, 上野 光一², 竹澤 俊明¹
(¹独法生物研, ²千葉大院・薬)

【目的】ラット初代肝実質細胞（以下、肝細胞）の機能維持に優れた培養系を開発するために、種々の細胞外マトリックス（以下、ECM）成分よりゲル薄膜を作製してきた。一方、肝細胞を播種したI型コラーゲンゲルにI型コラーゲンゾルを重層するサンドイッチ培養法が機能維持に優れているという報告がある。本研究では、肝細胞を播種したゲル薄膜について各種ECM成分のゾルを重層するサンドイッチ培養法を開発し、従来法であるコラーゲンゲルサンドイッチ培養法と肝細胞機能維持について比較検討した。

【方法】

ゲル薄膜サンドイッチ培養は、肝細胞をI型コラーゲンゲル薄膜上に播種後、各種ECM成分（I型コラーゲン、IV型コラーゲン、マトリゲル）のゾルを重層して作製した。経時的に位相差顕微鏡による形態観察、蛍光顕微鏡による生死判定およびアルブミン分泌量の測定を行った。

【結果および考察】

肝細胞の形態は、マトリゲルを重層したゲル薄膜サンドイッチ培養系では2日目以降に球状肝細胞の凝集が進行したが、その他の培養系ではいずれの肝細胞も9日目まで良好に生存した。アルブミン分泌能はI型コラーゲンを重層したゲル薄膜サンドイッチ培養系で9日目において他の培養系に比べ高く、ゲル薄膜サンドイッチ培養法の有用性が示唆された。

A novel vitrigel-Sandwich culture system excellent for maintaining
functions of rat primary hepatocytes.

○Yukiko NAKAZAWA^{1,2}, Koichi UENO², Toshiaki TAKEZAWA¹
(¹Natl. Inst. Agrobio. Sci., ²Chiba Univ.)

Key words vitrigel, sandwich culture, hepatocyte, extracellular matrix

3H09-5 インスリン分泌細胞株の足場の検討

○金山 貴宣¹, 寺田 聡¹, 竹澤 俊明²
(¹福井大工・生応化, ²独法生物研)

【目的】膵島移植が糖尿病の治療法として期待されている。膵島そのもの、あるいは膵島細胞の機能を維持もしくは向上する培養技術が実現すれば、膵島移植に大いに貢献できる。そこで本研究では、インスリン分泌細胞を対象として足場に着目した検討を行った。【方法】付着細胞用の培養プレート（住友ベークライト）にI型コラーゲン、IV型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンをコーティングした。これらを用いてラットインスリンーマRIN-5Fを培養し、形態変化、増殖、インスリン産生を検討した。【結果】細胞増殖、インスリン産生について大差は見られなかったが、形態についてはラミニンが最も細胞の接着・伸展を促進しており、IV型コラーゲンがそれに続いた。一方、I型コラーゲンは接着を妨げ、細胞は凝集塊を形成していた。続いて血清飢餓状態で培養したところ、細胞の生存には大差はなかったが、インスリン産生はコーティングにより低下していた。

Effect of scaffolds on insulinoma cell culture

○Takanori KANAYAMA¹, Satoshi TERADA¹, Toshiaki TAKEZAWA²
(¹Univ. of Fukui, ²Natl. Inst. Agrobio. Sci.)

Key words diabetes, scaffold, cell therapy, islet

3H09-4 ラット各種臓器より作製した切片担体上でのラッ
トインスリンノーマ細胞株の培養

○柳原 佳奈^{1,2}, 斉藤 泰行^{1,2}, 寺田 聡², 三木 正雄²,
竹澤 俊明¹
(¹独法生物研, ²福井大院・工)

【背景および目的】膵島細胞の増殖誘導あるいは分化機能維持に優れた体外培養技術を確立するために、生体組織の微細構造や成分を保持している「組織切片」を培養担体に活用した研究を展開してきた。これまでに、成牛の膵臓より作製した切片担体上でラットインスリンノーマ細胞株 RIN5F を培養し、インスリン分泌能が向上する成果を得ている。一方、生体内膵島細胞からのインスリンの分泌制御には様々な臓器が産生した生理活性物質が関与する。本研究では、インスリン産生細胞に適した切片担体を模索するために培養する細胞と切片担体に用いる組織の動物種を揃えて、ラット各種臓器より作製した切片担体上での RIN5F 細胞の挙動を解析することを目的とした。【方法】SDラットより大脳、胸腺、心臓、肝臓、膵臓、腎臓、および精巣を摘出し、厚さ5μmの切片担体を作製した。担体上にRIN5F細胞を22万cells/cm²の密度で播種して5日間培養した。細胞の接着形態、増殖、および分化の解析は、それぞれ位相差顕微鏡観察とHE染色像、生細胞に陽性となるカルセイン蛍光の経時変化、および培養液中のインスリン測定により行った。

【結果】細胞は、胸腺、腎臓、心臓、および大脳の切片上では比較的小さいコロニーあるいは単独状態で接着し、膵臓、肝臓、および精巣の切片上では増殖性に富んだ大きい集塊を形成した。膵臓、肝臓、および精巣の切片上では培養3日目にインスリン分泌の向上が見られた。

Culture of a rat insulinoma cell line on the section substrata pre-
pared from rat organs.

○Kana YANAGIHARA^{1,2}, Yasuyuki SAITO^{1,2}, Satoshi TERADA²,
Masao MIKI², Toshiaki TAKEZAWA¹
(¹Natl. Inst. Agrobio. Sci., ²Univ. of Fukui)

Key words section substratum, insulin, insulinoma cells, cell culture

3H10-1 骨肉腫細胞を用いた平面絹・ヒドロキシアパタイト
ハイブリッドの構築

○高岸 克行^{1,2}, 新海 政重¹, 竹澤 俊明², 長棟 輝行¹
(¹東大院・工・化生, ²独法生物研)

【目的】既往の骨組織を再構築する研究では十分な力学的強度の達成が課題であった。そこで本研究では、石灰化を促進するCa²⁺強化培養液と力学的強度に優れた平面絹を骨形成細胞の培養に利用し、平面絹・ヒドロキシアパタイトハイブリッドを再構築すると共にその力学的特性の改善を試みた。【方法】滅菌した平面絹を型に置き、ヒト骨肉腫細胞株MG63を懸濁したトランスグルタミナーゼ含有のゼラチン溶液を注ぎ、ゲル化した。ゼラチンゲルに、10% FBSを含有するMEM培養液（MEM培養液）、または100 nM デキサメタゾン、8 mM CaCl₂を含有するMEM培養液（Ca²⁺強化培養液）を添加して4週間培養した。生化学的評価としてゲル中に堆積したカルシウムの定量を、組織学的評価としてHE染色およびArizarin Red S染色を、力学的評価として押し強度および引っ張り強度の測定を経時的に行った。

【結果】Ca²⁺強化培養液を用いて4週間培養したところ、MEM培養液と比較して顕著なカルシウムの堆積が確認された。平面絹を包埋した再構築体は、平面絹不含の再構築体と比較して高いカルシウム堆積量を示した。さらにゲル内部における均一な細胞の分布と、ゼラチンおよび絹近傍の石灰化が確認された。平面絹を包埋した再構築体は、平面絹不含の再構築体と比較して押し強度は約1000倍、引っ張り強度は約200倍に向上した。さらにCa²⁺強化培養液で4週間培養した場合、MEM培養液と比較して約2倍の押し強度を達成した。

Preparation of pressed silk sheet/hydroxyapatite hybrid material
utilizing human osteoblastic cells

○Yoshiyuki TAKAGISHI^{1,2}, Masashige SHINKAI¹,
Toshiaki TAKEZAWA², Teruyuki NAGAMUNE¹
(¹Dept. Chem. Biotech., Univ. Tokyo, ²Natl. Inst. Agrobio. Sci.)

Key words bone-like tissue, mineralization, silk, calcium