

代謝、解毒結果を良好に予測することが可能な *in vitro* 代替試験系の構築が望まれている。従来の2次元平面培養法は、臓器由来細胞が実際の生体での構造、機能を十分に保持していないため、ヒト生体反応を予測するには限界があり、代替試験系として不十分である。より生体に近い機能を発揮する培養法として3次元スフェロイド培養法が注目されている。日立では、ナノピラー細胞培養シート（NPシート）を開発し、ラット初代肝細胞の3次元スフェロイド培養に取り組んでいる。スフェロイド形成に対するナノピラーの影響を検証するため、5種類の異なるピラー直径を持つNPシートを用いてラット初代肝細胞を培養した。その結果、ピラー直径2.0 μm のNPシートにおいて、細胞生存率が高い、直径100 μm 以下のスフェロイドが最も数多く形成された。E-カドヘリンおよびアクチンの局在解析の結果、NPシートにより形成されたスフェロイドは生体肝臓と構造が類似していることが示された。透過型電子顕微鏡画像により、スフェロイドを構成する細胞は、生体肝細胞と同様の細胞極性を維持していることが示された。続いて、スフェロイドの高機能化を狙い、生体環境を模擬するためにマトリゲルの重層を試みた。リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析の結果、MRP2、アルブミン、P450-3A3の発現が、マトリゲル非重層のスフェロイド、従来の2次元平面培養、およびサンドイッチ培養に比べて上昇した。さらに、5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate (CDFDA)を用いて検証した結果、MRP2が胆管排泄を担うトランスポーターとして機能していることが示された。以上の結果から、特別な試薬や分子を塗布することなく、培養器材表面の物理構造のみを最適化することにより生体の構造に近いスフェロイドを形成できること、およびマトリゲル重層によりスフェロイドが高機能化することが示された。今後、新薬開発における *in vitro* 代替試験系を構築していくため、材料となる個々のスフェロイドの均質化が次の課題となる。スフェロイド径の均一化により、スフェロイドの均質化を図り、NPシートを用いた高再現性、高スループットな代替試験法の確立を目指す。

J4.

マイクロ電極を用いた細胞操作・計測

○周 広斌、宮崎 泰三、武田 志津
(株)日立製作所 中央研究所

再生医療用に利用される再生組織は、患者自身あるいは他者の体内から採取された細胞を体外において分離精製し、増幅や組織化等の加工工程を経て製造され、患者体内へ移植される。治療用細胞、特に接着細胞の増幅には、培養容器の培養面に接着して増殖するため、細胞密度が常に一定の範囲になるように調節する必要がある。従来の細胞播種方法として、一般に培養容器を揺らして細胞を自然沈降させる方法が使われている。しかし、培養液中に均一に攪拌された細胞は、培養面に着く際、培養表面の低い領域への凝集や周囲装置の振動による再浮揚が発生する。その結果、培養面積の利用低下や細胞接着せず死細胞率の増加を招く。また、自然沈降による培養面への細胞接着には数時間を要するため、細胞の接着から増殖に移るまで時間を要する。本研究は、バクテリアや細胞などの微粒子を操作する有効な誘電泳動現象を利用して積極的に細胞の均一播種や細胞接着時間の短縮を実現できる細胞プロセッシング技術を完成させることを目的としている。本発表では、細胞培養容器の培養面に設けるマイクロ電極を用いて、培養液中の細胞を速く培養面に固定させ、細胞の均一播種と短時間接着を行うことができることを実証している。さらに、細胞播種後や細胞増殖時のマイクロ電極間のインピーダンス変化を測定することにより、細胞播種密度や細胞増殖状況がモニターできることを示している。これらの技術を開発することにより、安価に細胞操作、計測の出来る細胞培養容器を実現できる可能性がある。