

**半導体原理に基づく再生軟骨細胞分化挙動の *in situ* モニタリングデバイスの創製**  
**Development of semiconductor-based biosensing device for *in situ* monitoring**  
**of regenerative chondrocyte differentiation behavior**

東京大学工学部<sup>1</sup>、東京大学大学院工学系研究科<sup>2</sup>、ハーバード大学メディカルスクール<sup>3</sup>

佐竹 皓宇<sup>1</sup>、齋藤 暁子<sup>2</sup>、加治佐 平<sup>2</sup>、水野 秀一<sup>3</sup>、坂田 利弥<sup>1,2</sup>

Faculty of Engineering Univ. of Tokyo<sup>1</sup>, School of Engineering, Univ. of Tokyo<sup>2</sup>,

Department of Orthopedic Surgery Harvard Medical School, Brigham and Women's Hospital<sup>3</sup>,

○H.Satake<sup>1</sup>, A.Saito<sup>2</sup>, T.Kajisa<sup>2</sup>, S.Mizuno<sup>3</sup>, T. Sakata<sup>1,2</sup>

[sakata@biofet.t.u-tokyo.ac.jp](mailto:sakata@biofet.t.u-tokyo.ac.jp)

【はじめに】整形外科領域において関節症は患者数が最も多い疾患の一つである。現在は再生治療として自家軟骨細胞移植法が開発され臨床応用されている。また、培養軟骨細胞に静水圧を負荷することで細胞外マトリックス (ECM) の生合成が増加することが水野らの研究によって明らかとなり、これを応用した治療法も臨床応用に近づいている。しかしながら軟骨細胞が分化するメカニズムは不明な点が多く、今後治療をより確実なものとしていくためには分化挙動の理解のもと制御し、再生軟骨細胞の安全性、妥当性を評価する指標を得る必要がある。本研究では半導体バイオセンシング技術を用いて、軟骨細胞の分化に深く関わる代謝活動や硫酸化糖の増加などイオン性物質の電荷挙動を非侵襲的に評価・計測可能か検討する。

【実験方法】評価には Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/(Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>)をゲート絶縁膜とする n チャネルデプレッション型の電界効果トランジスタ (Field Effect Transistor; FET) を用いた。実験には軟骨細胞 (Chondrocyte) を DMEM(10%FBS+1%PS/SM)で培養し用いた。測定前日に Trypsin 処理で細胞を回収し、1500rpm,5min で遠心洗浄後、細胞数をカウントし最終細胞濃度  $7.3 \times 10^5/\text{ml}$  で FET のゲート絶縁膜上に播種し一晩培養した。翌日、測定開始前に培養液の交換を行い、静水圧容器内に細胞を播種した FET を設置し、培養インキュベータ内(5%CO<sub>2</sub>,37°C,湿度 95~97%)に静置し気相と 2h~3h 平衡化後、測定を開始した。測定開始から 3 日おきに静水圧容器内の培養液の交換を行い、2 週間計測を行った。静水圧容器内との比較・検討のため、同様の条件で培養液添加可能(1ml)なガラスリングを取り付けた FET のゲート絶縁膜上に細胞を播種し計測を行った。その際、長時間培養での培養液の蒸発を防ぐためミネラルオイル (Mineral Oil Light; REPROLINE)を使用した。いずれの培養においても、アスコルビン酸を 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$  含む培養液で培地交換したものと、培養液のみで培地交換したものと 2 種類に分け、細胞の呼吸活性に伴う変化を電氣的に計測した。さらに、計測しているものと同様の条件にてディッシュに細胞を播種し、3 日おきに培養液の交換を行い、2 週間培養を行った。3 日おきに硫酸化グリコサミノグリカン (sGAG;sulphated glycosaminoglycans)の定量を全自動小型 ELISA 装置を用いて行った。

【実験結果】培地交換後の約 20 時間程度は表面ポテンシャルが 20mV 程度増加し、その後、培地交換前の電位へと戻っていく様子が明確に観察され、本研究により 2 週間という長期間に渡って軟骨細胞の呼吸活性を電位変化として非標識・非侵襲・リアルタイムで計測することに成功した。さらに当日は、アスコルビン酸添加による生化学的刺激だけでなく静水圧のような物理刺激環境での軟骨細胞計測の可能性についても報告する予定である。