

半導体バイオセンサによる再生ヒト軟骨細胞基質産生挙動の *in situ* モニタリング
**In situ monitoring of extracellular matrix produced by regenerative human chondrocyte
using semiconductor-based biosensor**

¹ 東京大学大学院工学系研究科、² ハーバード大学メディカルスクール
佐竹 皓宇¹、齋藤 暁子¹、加治佐 平¹、水野 秀一²、坂田 利弥¹

¹School of Engineering, Univ. of Tokyo

²Department of Orthopedic Surgery Harvard Medical School, Brigham and Women's
Hospital,

○H.Satake¹, A.Saito¹, T.Kajisa¹, S.Mizuno², T. Sakata¹

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最も患者数の多い疾患の一つである。現在は再生医療として自家培養軟骨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基質の生合成が促進されることが水野らの研究により明らかとなり[1]、これを応用した治療法も臨床応用に近づいている。しかしながら基質産生のメカニズムは不明な点が多く、今後治療法の信頼性を向上させるには基質産生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。前回までの報告で Ta₂O₅/Si₃N₄/SiO₂ 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)のゲート絶縁膜上にウシ軟骨細胞を播種し、生化学的刺激としてアスコルビン酸導入の有無による軟骨細胞応答の違いを測定したところゲート表面電位及び硫酸化グリコサミノグリカン(Sulfated glycosaminoglycan; sGAG)産生量に大きな差が生じることを報告した。本研究では新たにヒト膝関節軟骨細胞を使用し、ウシ軟骨細胞と同様生化学的刺激の有無により応答に差異が生じるか確認を行うと共に電位計測による軟骨細胞評価の可能性について検討を行った。

【実験方法と結果】

【電位測定】上記 FET のゲート絶縁膜上にヒト膝関節軟骨細胞を 7.3×10^5 cells/ml で継代し、DMEM(10%FBS+1%PS/SM)を用いて 37°C, CO₂5%インキュベータ内で一晩培養した。培地を交換した後 Ag/AgCl 参照電極を培地に差し込み、さらに培地の蒸発防止の目的でミネラルオイル(Mineral Oil Light: REPROLINE)500ul を加えた。その後三日ごとの培地交換の際、アスコルビン酸を最終濃度 5ug/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の二種類に分け二週間培養を行い、呼吸活性および産生された硫酸化糖等に由来するゲート表面電位変化をリアルタイム FET 測定装置を用いて計測した。

【細胞外基質の定量】4well ディッシュに電位測定の際と同様の条件でヒト膝関節軟骨細胞を継代し三日ごと培地交換を行いながら二週間培養した。培養後三日ごとにⅡ型コラーゲンおよび sGAG の定量を全自動小型 ELIZA 装置を用いて行った。またⅡ型コラーゲンおよびアグリカン mRNA 発現量をリアルタイム PCR を用いて計測した。本研究における電位変化および細胞外基質産生の結果の相関などについて当日議論したい。

【参考文献】

[1] S. Mizuno et al., Journal of Cellular Physiology 193:319–327 (2002)