

細胞の初期接着促進を目的とした酸素プラズマ処理の検討

Effect of oxygen plasma treatment for initial cell adhesion on fibrous scaffold

○ 石原瑞希 (電機大) 矢口俊之 (電機大) 大越康晴 (電機大) 荒船龍彦 (電機大)

山路舞香 (山梨大) 鈴木章泰 (山梨大) 本間章彦 (電機大)

Mizuki ISHIHARA, Tokyo Denki University
Yasuharu OHGOE, Tokyo Denki University
Maika YAMAJI, University of Yamanashi
Akihiko HOMMA, Tokyo Denki University

Toshiyuki YAGUCHI, Tokyo Denki University
Tatsuhiko ARAFUNE, Tokyo Denki University
Akihiro SUZUKI, University of Yamanashi

Abstract: Oxygen plasma has been expected as surface modification technique for enhancement of hydrophilicity. In this study, influence of oxygen plasma treatment for initial cell adhesion was estimated. PLLA nanofiber scaffold sheet was fabricated by using CO₂ gas laser supersonic drawing. After the fabrication, oxygen plasma treatment was carried out as a surface treatment for the PLLA sheet. NIH3T3 cells were captured on the PLLA sheet for 50 hours by using cultured cell monitoring system (CCM). As a result, cell concentration of initial adhesion was increased by the oxygen plasma treatment. The amount of initial cell adhesion at the PLLA sheet surface with oxygen plasma treatment was increased to approximately twice compared with non treated scaffold. It was observed that the oxygen plasma treatment enhanced initial cell adhesion. In this study, the oxygen plasma technique is promising method for surface treatment to enhance initial cell adhesion.

Key Words: Scaffold sheet, Oxygen Plasma Treatment, CO₂ gas laser supersonic drawing

1. 研究背景

再生医学分野において、細胞の足場材となるスキャフォールドは、重要なデバイスとして位置づけられる。一般的にスキャフォールドの特性は、スキャフォールド自身の素材に大きく依存する。また、使用用途に応じて、細胞接着性の他に、高い生体適合性や力学的な強度が求められるが、コラーゲンや高分子材料等の既存の素材では、これらの複合的な要求を満足するには不十分である。このような背景から、既存の素材の付加価値を高める為に、各種、表面改質が行われている。特に、細胞接着性は、スキャフォールドの親水性に大きく影響することが良く知られており^[1]、細胞接着性の改善を目的とした表面処理が、各種検討されている^[2]。中でも、反応性の高い酸素プラズマ処理は、親水性官能基の付与や、表面の粗化、電荷の蓄積、未結合手の形成によって、樹脂または金属表面の親水化処理として良く知られている^[3]。

そこで本研究では、酸素プラズマ処理に注目し、ポリ乳酸 (PLLA) 製の繊維性スキャフォールドに対し酸素プラズマ処理を施し、細胞の初期接着の安定化を目的とした表面処理効果について検討した。

2. 実験方法

細胞足場材料となる繊維性スキャフォールドとして、炭酸ガスレーザー超音速延伸法により PLLA 製繊維性シートを作製した。この PLLA シート表面に対し、高周波プラズマによる酸素プラズマ処理を 0, 0.5, 1, 3, 5, 10 分の時間にて実施した。この時の酸素プラズマ処理条件を Table 1 に記す。

Table 1 Radio frequency oxygen plasma conditions for surface treatment of PLLA scaffold sheet

| | |
|-----------------|--------------------|
| Gas pressure | 100 [Pa] |
| Gas flow late | 10 [sccm] |
| Processing time | 0.5,1,3,5,10 [min] |

そして、これらの酸素プラズマ処理を施した PLLA シート表面について、X 線光電子分光 (XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy) による表面組成分析を行った。更に、細胞接着性に対する酸素プラズマ処理の効果を検討するために、マウス胎児繊維芽細胞 (NIH3T3) による細胞培養実験を実施した。

細胞培養実験では、酸素プラズマ処理を施したシート (酸素プラズマ処理: 0.5, 1, 3 min) および未処理のシートを、それぞれガラスリングへ設置し、12 well plate (浮遊細胞用) の各穴に配置し、培地 (D-MEM (high glucose +10% FBS)) 中で 24 時間静置した。その後、PLLA シートに対し、NIH3T3 細胞を播種した。この時、播種濃度を 1.0×10^5 [cells/cm²] とした。3 時間静置した後、PLLA シートの繊維に接着した細胞のみを評価する為に、浮遊細胞 (繊維に接着していない細胞) を PBS で洗浄して除去し、別途、12 well plate に改めて配置し、D-MEM (high glucose +10% FBS) 10mL 中で細胞培養を、温度: 37°C、CO₂ 濃度: 5%、湿度: 100% の環境下にて 50 時間培養した。この間、リアルタイム細胞培養システム (CCM: Cultured Cell Monitoring System) にて、PLLA シートの繊維上の細胞を、ランダムに各 4 箇所 (各 5 枚) 撮影し、撮影した画像から細胞数を計測し、繊維上における細胞の初期接着の濃度を求めた。

3. 結果及び考察

3-1.XPS 測定結果

XPS により測定した PLLA スキャフォールドシートの表面状態 (Carbon 1s) を Fig.1 に示す。測定した Carbon 1s スペクトルを波形分離した結果、酸素プラズマ処理の有無に関わらず、C-C, C-O, C=O 結合の存在が確認された。特に、C=O 結合は、親水性に関与する官能基に由来するため、酸素プラズマ処理による C=O 結合の比率の変化は、細胞接着性に対し重要な要素となる。そこで、酸素プラズマ処理時間に対する PLLA シート表面の C=O 結合の変化を、Carbon 1s ピーク全体に対する強度比として Fig. 2 に示す。

Fig.2 より、PLLA シート表面において、酸素プラズマ処理時間に対する C=O 結合の強度比が変化していることが確認された。未処理（酸素プラズマ処理 0 分）の PLLA シートでは、Carbon 1s ピーク強度に対し 20%程度の強度比で C=O 結合が存在しているが、酸素プラズマ処理を行うことで C=O 結合の強度比は増加し、処理時間 1 min で C=O 結合の強度比は最も高い 35%となった。その後、継続して酸素プラズマ処理を行うと、C=O 結合の強度比は減少し、以降は酸素プラズマ処理時間に依存することなく、25%程度で安定し、C=O 結合の強度比に顕著な変化は見られなかった。これは、反応性の高い酸素プラズマを PLLA シート表面に照射し続けることで、初期段階（処理時間 1 min まで）で PLLA シート最表面に形成された C=O 結合が、その後は PLLA 繊維自身とともに分解され、これに伴って PLLA シート最表面の繊維の表面積が減少したことに起因するものと考えられる。

これらの結果から、酸素プラズマ処理によって、PLLA シート最表面の C=O 結合の増加を制御することが可能となり、酸素プラズマ処理 1 min の際に、効果的な親水化処理が見込まれると考えられる。

3-2.培養実験結果

50 時間の培養により細胞がコンフルエント状態になり、各処理条件において PLLA シート上で問題なく増殖していることが確認された。

酸素プラズマ処理を施した PLLA シートについて、初期接着の細胞数を Table2 に示し、結果を基に算出した C=O 結合の強度比に対する細胞の初期接着の様子を Fig. 3 に示す。Fig. 3 より、C=O 結合の比率が上昇するほど細胞の初期接着が上昇していることが確認された。酸素プラズマ処理時間 1 min で C=O 結合の強度比が最大の 35%に増加した PLLA シートでは、細胞の初期接着は約 4.0×10^4 cells/cm² となった。これに対し、酸素プラズマ処理を行っていない PLLA シートでは、細胞接着は約 2.0×10^4 cells/cm² 程度であった。これらの結果から、本酸素プラズマ処理では、未処理の PLLA シートに対し、2 倍程度の細胞接着効果が得られた。また、Fig. 3 の結果より、PLLA シート表面の C=O 結合の強度比と細胞接着性との間に、高い相関性が認められた。

これらの結果より、PLLA シート表面に対し、酸素プラズマ処理を施すことで、酸素を含む官能基に由来する C=O 結合が増加し、細胞の初期接着が促進したものと考えられる。

4. 結論

炭酸ガスレーザー超音速延伸法で作製した PLLA シートに対して酸素プラズマ処理を行った。その結果、PLLA シート表面の C=O 結合が増加し、細胞の初期接着が促進され、PLLA スキャフォールド表面において、安定した細胞増殖が見込まれた。これらの結果から、高周波プラズマによる酸素プラズマ処理は、細胞の初期接着を促進する表面処理技術として有効であることが示された。

5. 参考文献

- [1] 吉成正雄, 松坂賢一, 井上孝, 小田豊, 下野正基, 早川徹, “超親水性表面は骨芽細胞の増殖を促進する”, 日本再生医科学会誌, Vol. 2, No. 1, pp. 20-28, 2004.
- [2] 江黒徹, 村田功, 大橋功, 前川修一郎, 吉成正雄, “チタンの親水性に及ぼす表面形状と表面化学修飾の影

響”, 日本口腔インプラント学会誌, Vol. 24, No. 2, p. 215, 2011.

- [3] 多留康矩, 高岡京, “プラズマ処理によりポリプロピレン表面に生成した極性基の反転”, 高分子論文集, Vol. 43, No. 6, pp. 361-367, 1986.

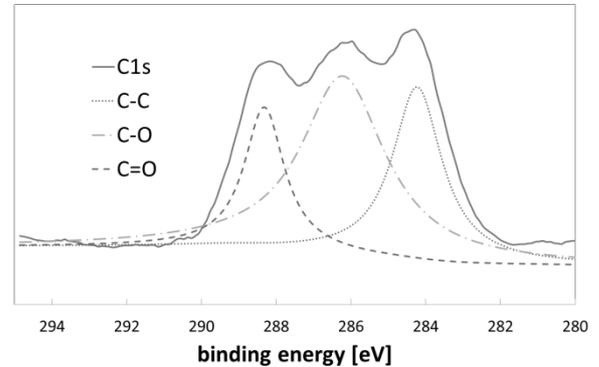


Fig.1 XPS analysis of PLLA nanofiber sheet. The carbon 1s spectrum contains C-C, C-O, and C=O components.

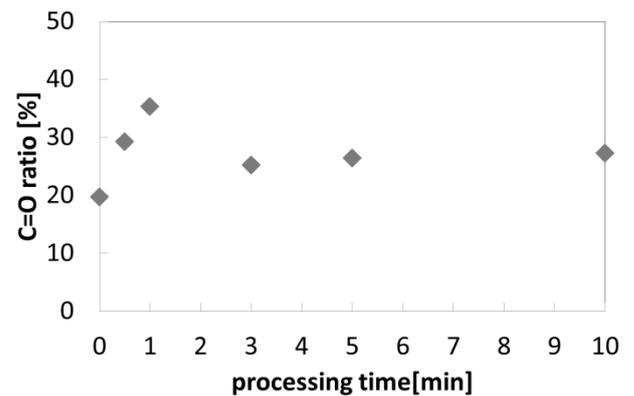


Fig.2 Change of C=O ratio at PLLA nanofiber sheet with oxygen plasma processing time

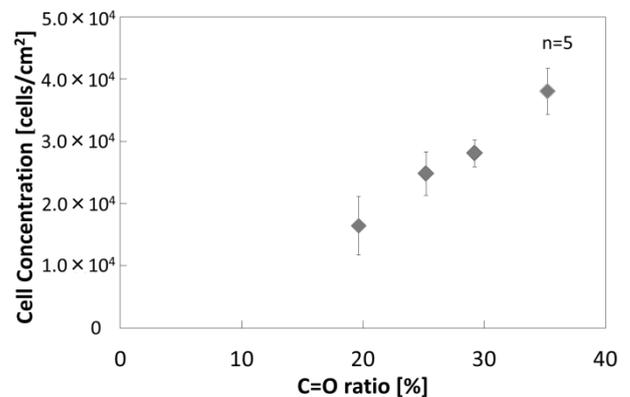


Fig.3 Relationship between cell concentration and C=O bond ratio at surface of PLLA nanofiber sheet