

繊維性スキャフォールドを用いた細胞運動形態評価システム

Cell Movement Morphology Evaluation System Using Fibrous Scaffold

○ アブドゥルラヒンヌルシュハダー (電機大), 志村まり(国際医療研究センター), 松永章弘(国際医療研究センター), 大越康晴(電機大), 荒船龍彦(電機大), 本間章彦(電機大)

Abdul Rahin NUR SHUHADAH, Denki University
Shimura MARI, National Medical Research Center
Matsunaga AKIHIRO, National Medical Research Center
Ohgoe YASUHARA, Denki University
Arafune TATSUHIKO, Denki University
Homma AKIHIKO, Denki University

Abstract: In regenerative medicine, a system for managing the production process and quantitative evaluation of tissue consisting of living cells has not been established yet. In cell culture, there is a need to analyze the cell present with the behavior of the collective cells movement. In this study, using the main fibroblasts cells of tissue regeneration, we evaluate the influence of different culture surface design using electrospinning method and different types of DLC coating to the motion form of population cells and perform a quantitative evaluation. Before coating the culture surface, aligned scaffold fiber was produced for the experiment. Two types of culture surfaces were used: deposition of a-C:H coating and deposition of a-C:H:N surface. As a control, the cell behavior was evaluated from the scaffold itself without any coating. Different membrane surfaces results on different cell migration, proliferation and were quantitatively evaluated.

Key Words: Scaffold, electrospinning, cell culture, a-C:H coating, migration

1. はじめに

ウイルスや、腫瘍細胞などが生体内細胞にどの様に感染、作用し、発病するのかを細胞レベルで解析するため、我々はエレクトロスピニングによる繊維性スキャフォールドカートリッジによる三次元培養と、培養後にウイルスや試薬添加が可能な2系統還流培養システムの開発を行ってきた。従来市販されている中空糸膜カートリッジでは培養しながら細胞の挙動や数を観察することが困難であった。

一方、現在の医療現場で使用されている生体材料の多くは、工業汎用性材料を医療用に加工したものであり、機械的特性は優れているものの、生体に対する適合性は満たされていない。そこで注目を浴びているのが、既存の生体材料の特性を保持したまま生体適合性に優れた材料表面を付加できる表面改質技術である。先行研究では、原料ガスとしてメタン(CH₄)のみで作製した a-C:H 膜と、CH₄ に窒素(N₂)を 20、40、60[%] ドープして作製した a-C:H 膜(a-C:H:N 膜)を、生体内の構造を模擬している繊維性スキャフォールド上に成膜し、スキャフォールド繊維上において、単一細胞の挙動を解析することで細胞に及ぼす窒素添加の影響について検討した。その結果、被膜無のスキャフォールドにおける細胞接触率は 8.41%であったのに対して、窒素 60%の a-C:H:N 被膜では、接触率は 51.46%となり、約 6 倍の接触率を示した。しかし、細胞接触率に対して a-C:H:N が与える影響については不明である。

以上の背景から本研究では、組織再生に重要な繊維芽細胞を用い、細胞から組織に至る培養中の異なる培養面における集団細胞の運動形態を非侵襲的、かつ定量的に評価を行うことを目的とした。細胞足場構造が集団細胞挙動に与える影響を定量的に評価するために、エレクトロスピニング法を用いた培養面設計に成膜した a-C:H 膜および a-C:H:N 膜表面に細胞培養を行い、細胞の移動、増殖、被覆など定量的に評価することを目的とする。

2. 方法

2.1 基材作成

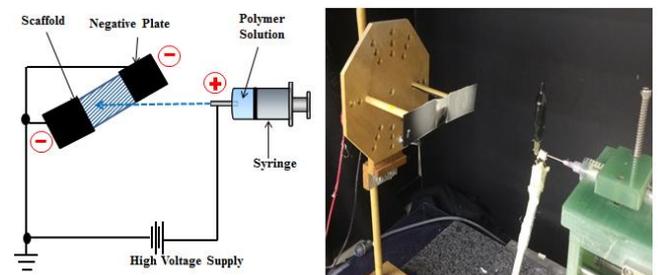


Fig.1 Electrospinning Method

高分子溶液を注入したシリンジのニードル先端にプラスの電圧を印加させるエレクトロスピニング法により、ニードル先端から電荷を帯びた噴流が発生させ繊維を形成し、形成過程で有機溶媒が揮発することによって二つの陰極版(横:5.0cm、縦:2.5cm)を 2cm 間隔設置し、陰極版の間の繊維を集積し、配向性を持つ三次元構造の薄膜をスキャフォールドとして形成した。

2.2 r.f.plasma CVD 法による Scaffold 繊維表面への a-C:H 被膜

作製した繊維性スキャフォールドに、高周波プラズマ CVD(Chemical Vapor Deposition)法を用いて a-C:H:N 膜を成膜した。成膜は原料ガスに CH₄ と N₂ を使用し、ガス流量 30[cc/min]、電力 100[W]、ガス圧力 100[Pa]、成膜時間 5[min] の条件で成膜した。なお、原料ガスの N₂ ドープ量は総流量の 0%と 60[%]とした。物性評価は、走査型電子顕微鏡(SEM)による表面形状の観察を行った。

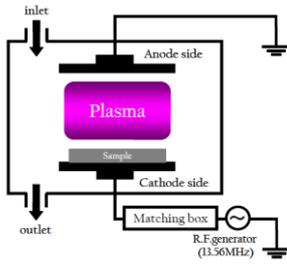


Fig.2 Schematic View of CVD Machine

2.3 細胞培養と挙動観察

今回、評価対象とした細胞にはマウス由来の繊維芽細胞株である NIH-3T3 を用いた。比較するためのコントロールとして、同一のシャーレ（成膜なし）を用いた。細胞培養環境を下記表に示す。

Cell	NIH-3T3
Cell Medium	D-MEM (High glucose)
Air	5% CO ₂ in air
Culture Concentration	$X_0 = 0.5 \times 10^4$ cells/cm ²

Table 1 Cell culture conditions

3. 結果

3.1 r.f.plasma CVD 法による Scaffold 繊維表面への a-C:H 被膜

a-C:H 被膜をした SEM 画像結果を以下に示す。

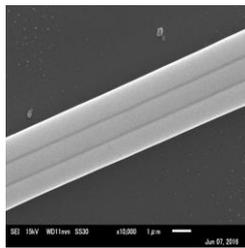


Fig.3 Non-coating scaffold

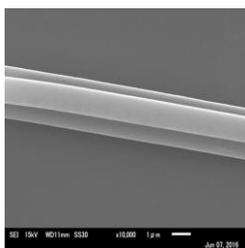


Fig.4 Coating N2 (0%) scaffold

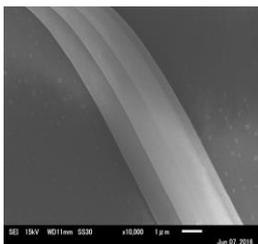


Fig.5 Coating N2 (60%) scaffold

3.2 細胞培養と挙動観察

細胞培養を一日目と二日目の画像は以下に表す。

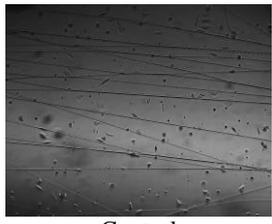
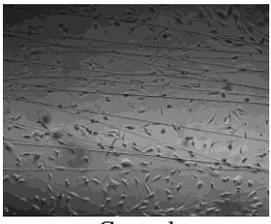
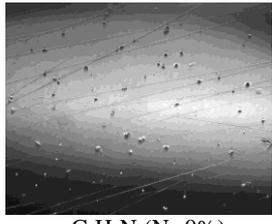
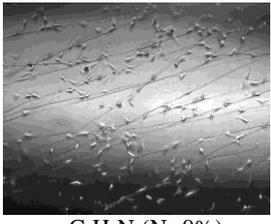
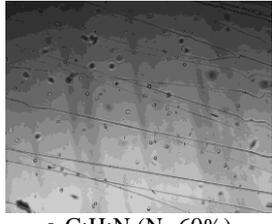
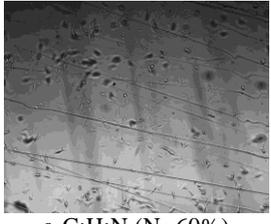
Culture Day 1	Culture Day 2
 Control	 Control
 a-C:H:N (N ₂ 0%)	 a-C:H:N (N ₂ 0%)
 a-C:H:N (N ₂ 60%)	 a-C:H:N (N ₂ 60%)

Table 2 Cell culture observations

4. 考察と結論

SEM 画像結果から a-C:H:N 0%と 60%の成膜は異なる積層が見られ、それは Fig.7 と Fig.8 それぞれ a-C:H:N 層であった。コントロールの表面は構造は異なる層は見られなかった。

また細胞培養の実験結果により、成膜無しのコントロール上での培養では、多くの細胞が繊維以外のガラスプレート上にも多く停留しそこで増殖したのに対し、a-C:H:N 成膜条件のスキヤフォルドにおける細胞の挙動は繊維上を選択的に遊走しながら増殖する細胞が多く観察された。

以上のことから、本 a-C:H:N 成膜スキヤフォルドを用いることで、細胞の移動速度や移動挙動を定量評価することが可能となった。

参考文献

- (1) 大島宣雄:[入門 医工学], サイエンス社, p-172, 2008
- (2) 上岡なぎさ 他: ヒト三次元培養皮膚への遺伝子導入法の確立と表皮分化へのCキナーゼの関与, 昭和医学会雑誌, 2011
- (3) Chen Liu : The effect of the fibre orientation of electrospun scaffolds on the matrix production of rabbit annulus fibrous-derived stem cells, Bone Research 3, article number: 15012(2015)
- (4) 平栗健二, 尾関和秀, 大越康晴, 中村挙子, 小松直 樹, 長谷部光泉, 鈴木哲也, 炭素系材料の将来予測 -2050 年に向けて, NEW DIAMOND vol. 100, pp. 70-73, 2011.
- (5) 大竹尚登監修, DLC の応用技術, シーエムシー出版 2007