

細胞培養における培養面の表面性状が培養に及ぼす影響

国立東京工業高等専門学校 ○今田 哲平, ◎角田 陽

要旨

バイオテクノロジー技術の進展とともに、細胞培養技術の高度化が重要となっている。そうした中で、本研究の目的は、未だ不明瞭である細胞培養における培養面の表面性状が細胞の成長に及ぼす影響を明らかにすることである。本研究では、表面性状のうち、特に培養面の表面粗さのみを変えた場合についての培養実験を行うことで、表面粗さが培養時の樹状突起の長さや細胞の付着率等に及ぼす影響について明らかにした結果を報告する。

1. はじめに

PC12 細胞とは、ラットの副腎髄質由来の褐色細胞腫で、神経成長因子(Nerve Growth Factor: NGF)を加えることで樹状突起を伸長し、交感神経細胞様に分化する。この性質から、細胞の分化や樹状突起を必要とする実験に利用される。PC12 細胞の外観を Fig. 1 に示す。

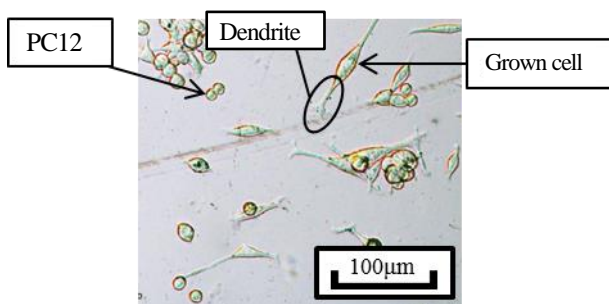


Fig. 1 Micro scope image of PC12 Cell

哺乳動物のすべての細胞は、成長や増殖する際に細胞外マトリックス(細胞間などに存在するタンパク質)との接着が必要である。PC12 細胞も例外ではない。培養面の表面粗さが粗くなれば、表面積が増える分、付着に必要な細胞外マトリックスが多くなるが、平坦である方が培養面に密着しやすくなるとも考えられる。しかし、表面粗さ以外の条件を同一にし、成長に対する表面粗さの影響を実験的に明らかにした研究は見あたらず、定量的な関係性は不明確のままと見受けられる。一部で表面粗さが異なる場合の細胞培養の付着率が調べられているが、表面粗さに対する材料の種類は同一ではないため、粗さのみの影響は明確化されていないのが現状である¹⁾。

そこで、本研究では、培養面の表面粗さのみを変えた場合について、PC12 細胞の培養の比較実験を行い、表面粗さごとの細胞の付着率と樹状突起の平均長さに着目し、培養面の表面粗さとの関連性を明らかにすることを目的とする。

2. 実験方法

2.1 実験装置

本研究では、表面粗さ試料作製に Okamoto 製の平面研削盤 GRIND-X PSG52DX を使用し、表面粗さの測定にはミツトヨ製の表面粗さ計 SURFTTEST EXTREME SV-3000 CNC を用いた。細胞培養には Asahi 製のインキュベータ CO₂ Incubator 4020、観察測定には Nikon 製の工業用顕微鏡 ECLIPSE LV100ND を用いた。

2.2 培養面作製

培養面の材質を一定にするために、さまざまな材料と加工法で作製された試料面を PDMS で転写した面を培養面とする。転写元となる試料と PDMS で転写後のそれぞれの表面粗さの測定結果を Table 1 に示す。試料 A は培養に一般的に用いられる市販ディッシュの表面、試料 B, C, D, E, F, G, H は SS400 を平面研削することで作製した試料、試料 I は市販の表面粗さ標準片(日本金属電鍍社製、比較用表面アラサ標準片)

のうち、平面研削で最も粗い面を選択した試料となっている。使用する培養面の一例として、試料 B, D, H, I の表面を Fig. 2 に示す。

Table 1 Surface roughness of culture surface

Sample	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Original surface Ra[μm]	0.03	0.18	0.22	0.26	0.28	0.29	0.31	0.35	0.53
PDMS transferred surface Ra[μm]	0.10	0.16	0.21	0.19	0.24	0.19	0.29	0.33	0.56

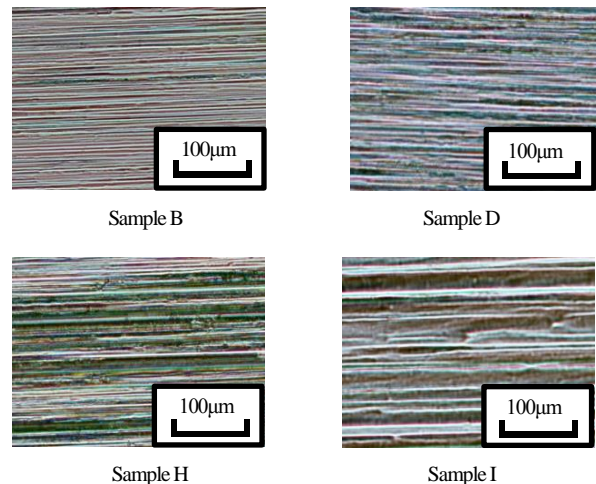


Fig. 2 Examples of micro scope images of surface roughness

2.3 細胞培養

2.3.1 培養面処理

作製した PDMS 面は疎水性であり、何も処理を行わずに細胞培養すると、培養面の付着が弱くなってしまふ。そのため、作製した培養面にプラズマ処理による表面改質を行い、培養面に親水性を持たせる。プラズマ処理の効果は数時間程度であるため、プラズマ処理が終わり次第、培養面に POLY-L-LYSINE を塗布する。POLY-L-LYSINE 塗布した翌日に細胞培養を開始する。

2.3.2 実験条件

細胞数、NGF 添加量、インキュベータ内温度および CO₂ 濃度を Table 2 に示す条件にそって細胞培養を行う。また、観察期間は細胞培養を開始した翌日からの 4 日間とし、観察結果を工業用顕微鏡で毎日記録し、評価を行う。以上に述べた実験全般の工程を Fig. 3 に示す。

Table 2 Experimental conditions

Number of cells	5000cell/cm ²
Temperature	37°C
CO ₂ concentration	5%
NGF	1 μL

2.4 評価方法

本研究では、細胞の付着率と樹状突起の平均長さを評価する。評価を

行う範囲は、顕微鏡の倍率×100時の観察画面に入るとする(0.65×0.85 mm, 約0.55 mm²).

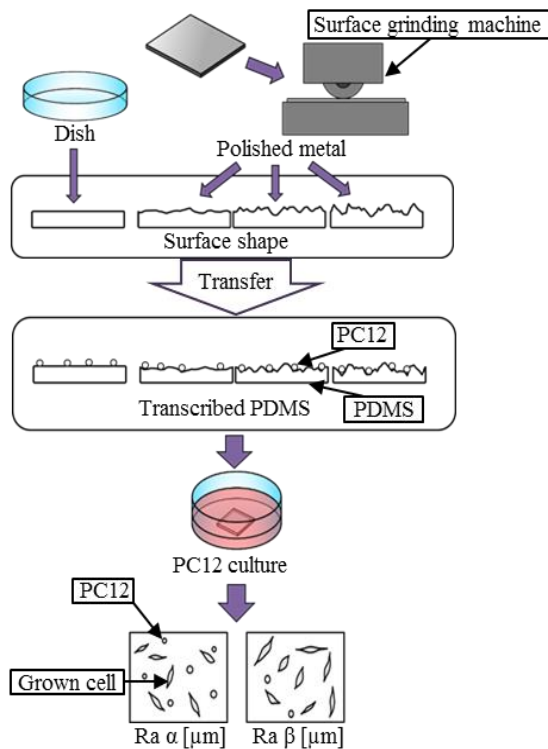


Fig. 3 Experimental steps

PC12 細胞は足場依存性(成長、増殖に培養面との付着が必要という性質)があるため、成長している細胞は培養面に付着していることになる。したがって、本研究での付着率を、

$$\frac{\text{樹状突起の伸長している細胞数}}{\text{全体の細胞数}} \times 100[\%]$$

と定義し、樹状突起の平均長さは次式、

$$\frac{\text{樹状突起の長さの総和}}{\text{樹状突起の伸長している細胞数}} [\mu\text{m}]$$

にて求める。

実験の再現性やばらつきに関しては、1つの実験条件に対し3回以上の細胞培養を行い、それぞれ3か所のデータを採ることによって評価をする。なお、結果のばらつきを最小限にするために、実験はすべての粗さで同時に行った。

3. 実験結果

4日目の付着率-表面粗さのグラフを Fig. 4、4日目の樹状突起の平均-表面粗さのグラフ(エラーバーは標準偏差を示す)を Fig. 5 に示す。

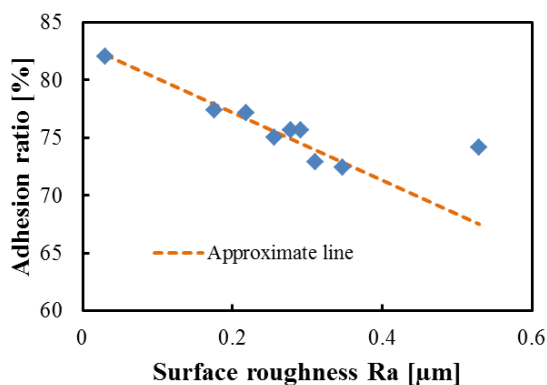


Fig. 4 Adhesion ratio of grown cell

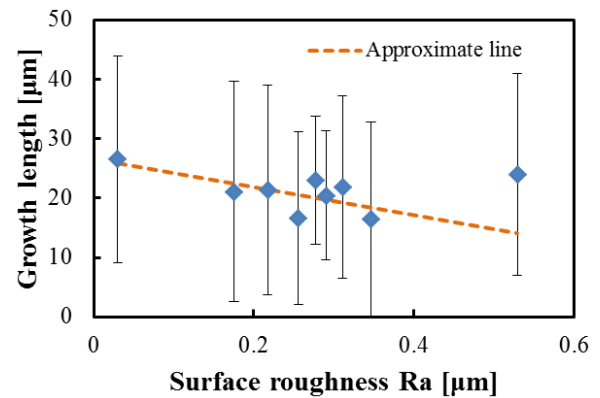


Fig. 5 Length of grown cell

また、本実験の中で最も粗さの小さい試料 A の日ごとの付着率、樹状突起の平均長さのグラフを Fig. 6 に示す。

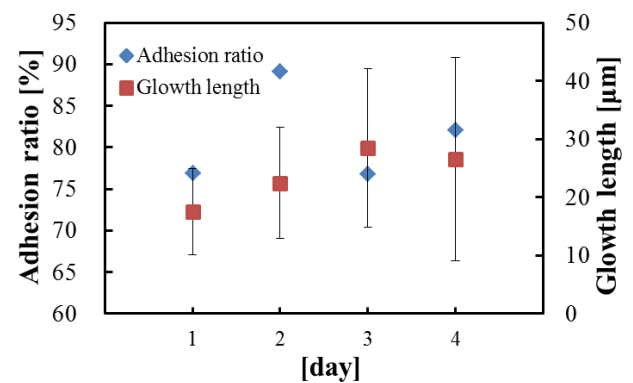


Fig. 6 Cell culture deepened as the days

4. 考察

実験結果から、本実験条件内では、差は大きくはないものの、付着率と樹状突起の平均長さのどちらも培養面の表面粗さが小さくなるほど上昇する傾向を示している。

粗い面の方が単位面積当たりの細胞外マトリックスの量が多くなり、付着しやすくなる可能性があるが、それ以上に培養面の平坦さが重要であると考えられる。

ただし、市販の粗さ標準片を転写して作製した培養面(Ra 0.53μm)は、粗さが大きいにもかかわらず、樹状突起の平均長さが2番目に高いという結果となった。これは、培養面が粗くても成長する可能性以外に、成長している細胞の多い箇所ばかりを観察した可能性、細胞の調子の差異という可能性が考えられる。

5. まとめ

表面粗さのみを変えた細胞培養実験を行い、本実験条件内では、表面粗さが小さくなるにつれて、付着率、樹状突起伸長のしやすさが向上する傾向にあることを示した。

参考文献

- 1) 原万里子ら: さまざまな高分子基板におけるPC12細胞の形態観察, 日本化学会誌, No.4 (2000), pp. 257-265
- 2) 波多野圭紀: 培養プラスチック板の表面粗さが培養骨芽細胞の増殖と分化におよぼす影響, 九州歯会誌, 53号 (1999), pp. 139-148