日本機械学会論文集（A 編）
77 巻 775 号（2011-3）

論文 No. 10-0045

L929 線維芽細胞の増殖性と接着性に及ぼす基材表面の微細凹凸形状の影響*

長井篤[*1]，宮田昌悟[*2]，斉藤万里雄[*1]，小茂鳥潤[*2]，小尾晋之介[*2]，難波洋司[*3]，小山尹誉[*3]

Effect of Surface Character on Proliferation and Adhesion of L929 Fibroblast

Atsushi NAGAI, Shogo MIYATA[*2], Mario SAITO, Jun KOMOTORI, Shinnosuke OBI, Yoji NAMBA and Tadayoshi KOYAMA

[*2] Faculty of Science and Technology, Keio University,
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa, 223-8522 Japan

In this study, the effects of Fine Particle Peening (FPP) treatment on adhesion and proliferation in L929 fibroblast were investigated. FPP treatments were performed on the Ti-6Al-4V alloy specimen by using TiO_2 (T series) , glass beads (G series) and Alumina (Al series) shot particle. The polished specimen (P series) was also prepared. Cell culture tests on the specimen were carried out with L929 fibroblast after 6 hours, 1, 3 and 5 days culture. Cell proliferation was evaluated by counting the number of cells by MTT assay. Cell adhesion strength was also measured by counting the number of cells detached by fluid-induced shear stress. The FPP treated surface by using shot particle of varied materials, which have different surface character. The TiO_2 series showed good cell proliferation. This was because the protein adsorption of TiO_2 series encourage cell adhesion. The detachment cells on the specimen were observed after share stress loading. The FPP treated series showed good cell adhesion. This was because the microscopically surface topography encourage cell adhesion.

Key Words : Biomaterials, Biological Engineering, Surface Improvement, Fine Particle Peening, Cell Culture, L929 Fibroblast, Titanium, Surfacetopograpy, Protein Adsorption

1. 緒　　言

近年，生体外で培養した細胞を治療に用いる細胞療法に関する研究が積極的に実施されている．例えば，急性肝炎の初期治療では，肝細胞を用いて血液浄化を行い，肝機能の回復を図っている．また，抗がん剤をはじめとする医薬の開発研究に対しても，大量の細胞が必要とされる．したがって，細胞療法の利用拡大のためには，様々な細胞を短期間で大量に培養する技術の開発が急務と考えられる．

培養の効率を高める手法として，培養基材の表面にタンパク質を塗付し，細胞の接着特性を変化させる技術が挙げられる．このような生化学的手法を用いた細胞接着性に優れた基材表面の作製には，高度な技術とコストを要するものと想定される．したがって，そのような技術を用いることなく，基材そのものの特性を高めることが重要と考えられる．それに関連し，Kunzler ら[(1)]は，同一基材上で系統的に粗さを変化させ，その上で線維芽細胞を培養した結果，粗さ変化によって異なる細胞増殖性を示すことを報告している．また，Jayaraman ら[(2)]は，機械加工，ブラスト処理を施した表面上で骨芽細胞を培養した結果，細胞増殖性は凹凸形状などの物理的要因および化学的な要因によって変化することを報告している．他にも，基材表面の微細凹凸形状を変化させた際の細胞増殖性について数々の報告[(3)~(10)]がされている．しかしながら，基材表面の微細凹凸形状が細胞挙動に及ぼす影響について増殖性，接着性の観点から詳細に検討した報告はない．

* 原稿受付　2010 年 1 月 19 日
[*1] 慶應義塾大学 理工学研究科 総合デザイン工学専攻専攻（〒223-852　神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1）
[*2] 正員，慶應義塾大学 理工学部 機械工学科
[*3] バイオシステムメディカルテクノロジー(株)
E-mail : miyata@mech.keio.ac.jp

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers

本研究では細胞増殖性に優れる表面を創製することを目的として，TiO_2，ガラス，Al_2O_3 粒子を用いた微粒子ピーニング（FPP）処理により Ti-6Al-4 合金の表面の微細凹凸形状を変化させ，その表面上における細胞増殖性，接着性の評価を行った．また，細胞増殖性，接着性に及ぼす基材表面の微細凹凸形状の影響について検討を加えた．

2. 実験方法

2・1 基材の作製

細胞培養を行う基材には，生体材料として利用されている Ti-6Al-4V 合金を用いた．同材を，円盤形状（ϕ15 mm × 4 mm）に機械加工した後，耐水エメリー紙（#320 - #1200）を用いて一方の端面を研磨した．次に，二酸化チタン（粒径: 50 μm 程度），ガラスビーズ（粒径: 50 μm 程度），アルミナ（粒径: 30 μm 程度）を用いて，ピーニング処理を行った（以下，T シリーズ，G シリーズ，Al シリーズと呼ぶ）．また，比較のために鏡面状に研磨した試験片も準備した（P シリーズ）．ピーニングに用いた投射粒子を図 1 に示す．

微粒子ピーニングにより作製された試験片表面は，走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて観察した．また，試験片表面のプロファイルおよび表面粗さは，非接触 3 次元表面形状・粗さ測定機により測定した．

2・2 細胞増殖性の評価

本研究では，図 2 に示すマウス由来線維芽細胞（L929 細胞）を用いて種々の評価を行った．まず，試験片を 99.5 v/v%エタノール（SAJ）を用いて超音波洗浄した後，180 ℃，2 h の条件で乾熱滅菌を施した．次に試験片を 24 ウェルプレートに配置し，培地に懸濁した 1×10^4 cells の L929 細胞を試験片に播種した．なお，培養液は，Eagle's MEM 溶液 100 ml に対し，ウシ胎児血清（FBS）10 ml，L-グルタミン 0.03 mg，炭酸水素ナトリウム 0.7 g 添加したものを使用した．また，培養は 37 ℃，5 %CO_2 インキュベータ内で行った．

まず，細胞の基材に対する増殖性について評価するため，1，3，5 日後における細胞数を MTT assay（CellTiter96 Non-Radioactive Cell Proliferation Assay，Promega）[11]を用いて測定した．また，初期細胞接着性の評価は，6 h 後における細胞数を測定することにより行った．なお，本研究で用いた L929 細胞における MTT assay 値の信頼性を評価するために，市販の培養ディッシュで培養された L929 細胞を用いて assay 値と細胞数の検量線の作成を行った．

2・3 せん断応力を用いた細胞接着強度の評価

細胞の基材に対する細胞接着強度を調べるために，水の流れにより生じる壁面せん断応力を試料表面に付与することができる装置を構築した．図 2 に装置断面の模式図を示す．本装置は，注射器に充填したイーグル MEM 培地（FBS 不含）50 ml を幅 20 mm，高さ 0.5 mm の流路内に一定の速度で押し出すことで，流入口より 120 mm 下流部に設置された試験片表面に理論上一様に壁面せん断応力を発生させることができる．本研究では，流速を変化させることで，低せん断応力として 1.75 Pa，高せん断応力として 2.61 Pa の二通りのせん断応力を細胞接着面に与えた．なお，流速と試料表面の壁面せん断応力の対応は，等価の境界条件で実行した商用コード（Fluent Ver 6.3）による 3 次元数値解析の結果に基づいて，試料表面のせん断応力の算出値の平均値として求めた．基材表面には微細な凹凸が存在することから，線維芽細胞の接着部分において，厳密には流体のもたらすせん断力は局所的に変化する．しかしながら，本実験では流体による壁面せん断力は数値解析によって算出された数値で一様に与えられると仮定した．

細胞剥離試験の試料には 10×10^4 cells の L929 細胞を各試験片上に播種した基材を用いた．24 h 培養を行うことで，細胞を十分に接着させた後に，試験片を装置に設置し，細胞接着面にせん断応力を付加し細胞を剥離させた．せん断応力付加前後の試験片上の細胞数は MTT assay によって測定した．これにより細胞の剥離率とせん断応力の関連性について検討を加えた．

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers

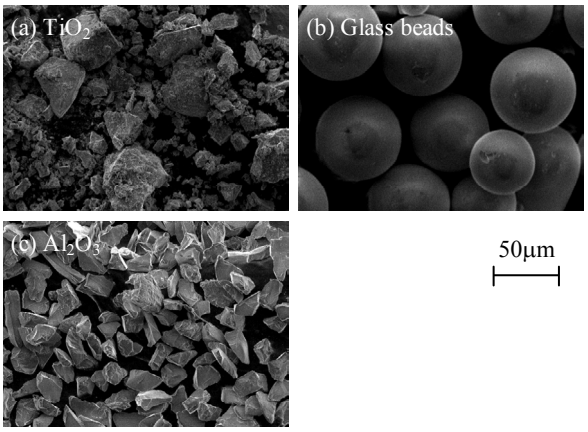


Fig.1 The particle of FPP treatment; (a) TiO_2, (b) Glass beads and (c) Al_2O_3 .

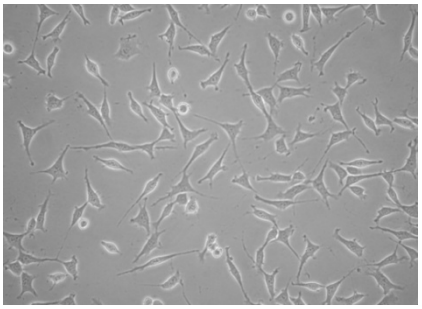


Fig.2 L929 fibroblast.

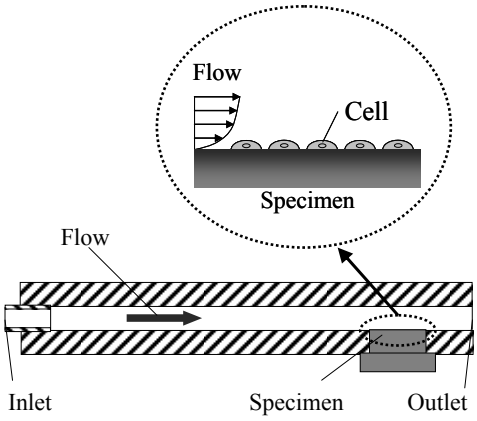


Fig.3 Shear stress loading system.

3. 実験結果および考察

3・1 試験片表面の観察

図 4 に P，T，G，Al シリーズ表面の SEM による観察結果を示す．また，図 5 には，試験片表面のプロファイルを測定した結果を，表 1 に試験片表面の粗さを測定した結果を示す．試験片表面の粗さは，高さ方向の粗さの代表的な指標として算術平均粗さ（*Ra*），横方向の指標として輪郭曲線要素の平均長さ（*Rsm*）を測定した[12]．G シリーズ表面は，比較的ゆるやかな曲線を有する凹凸となっていることがわかる．これは，投射粒子が球状であるため，それが衝突した圧痕がディンプル状の表面形状を形成したと考えられる．また，G シリーズと比較し，T および Al シリーズの表面は，複雑な凹凸が形成されていることがわかる．これは，投射粒子である二酸化チタンおよびアルミナが多角形状であることに起因しているものと考えられる．また，T シリーズおよび Al シリーズの凹凸形状は比較的類似していることがわかる．しかしながら，T シリーズは Al シリーズと比較し算術平均粗さ

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers

（*Ra*)は大きく，輪郭曲線要素の平均長さ（*Rsm*）も異なっており，凹凸スケールが異なる表面となっていることがわかる．

以上の結果は，異なる投射粒子を用いて微粒子ピーニング処理を施すことにより，培養基材表面の微細凹凸形状をコントロールすることができることを示唆するものである．

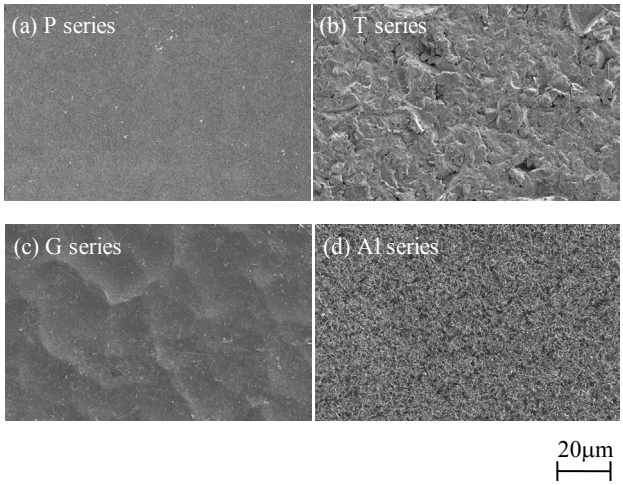
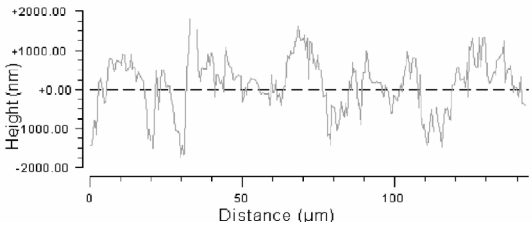
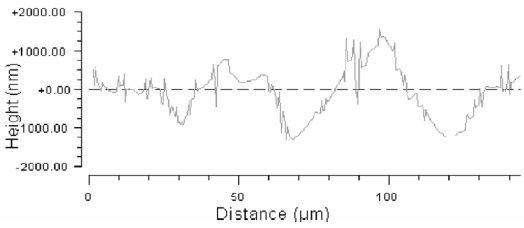


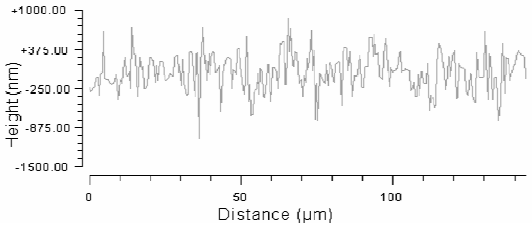
Fig.4 Typical features of the surfaces of specimen; (a) polished series, FPP treated with (b) TiO_2, (c) Glass.



(a) T series



(b) G series



(c) Al series

Fig.5 Profile of specimen surface.

Table 1 Surface roughness of specimen.

	P series	T series	G series	Al series
Ra (nm)	5	843	652	281
Rsm (nm)	-	700	520	213

3・2　細胞増殖性の評価

図 6 に L929 細胞を用いた MTT assay の検量線を算出し，信頼性評価を行った結果を示す．同図より，細胞数と MTT assay 値は比例関係にあることがわかる．したがって，同一株から採取した細胞においては，MTT assay 値を測定することにより，細胞数ならびに細胞数の増減を算出することが可能と言える．

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers

図 7 に，基材上での 5 日間の細胞培養により細胞増殖性の評価を行った結果を示す．同図より，細胞はすべてのシリーズの基材上で良好に増殖していることがわかる．

しかしながら，シリーズ間によって，その数は異なっていることがわかる．とくに，T シリーズ上における細胞数は常に高い傾向にある．また，G シリーズ上における細胞数も P シリーズと比較し増加している．一方，P シリーズと比較し，Al シリーズ上の細胞数は低いことがわかる．また，これらの傾向は，培養 5 日後のみならず，どの培養期間においても認められる．これらのことから，培養後の細胞数がシリーズ間によって異なる要因は，主に初期細胞接着数の差に起因するものと考えられる．

そこで次に初期細胞接着性の評価を行った．図 8 に 6 h 培養後に MTT assay を用いて細胞の基材に対する初期接着性を評価した結果を示す．同図より，培養 6 h 後における細胞の初期接着は，T シリーズおよび G シリーズが P シリーズと比較し，同程度もしくは高い傾向にあることがわかる．しかしながら，Al シリーズは，P シリーズと比較し，細胞の初期接着は低下していることがわかる．このことから，図 7 に示した培養後の細胞数の相違には，細胞の初期接着性の及ぼす影響が大きいことが明らかとなった．

さらに，シリーズ間によって細胞の初期接着数が異なる要因について検討を加えた．具体的には，各シリーズにおけるタンパク質の吸着性を調べた.図9に各シリーズにおいて24 h後のタンパク質吸着性を評価した結果を示す．同図から，T シリーズにおけるタンパク質吸着性は最も高く，Al シリーズにおけるタンパク質吸着性は最も低いことがわかる．図 8 に示したように初期細胞接着性は，T シリーズでは最も高く，Al シリーズで最も低い傾向を示したことから，タンパク質吸着性は細胞接着性に影響を及ぼすものと考えられる[13]．図 10 にタンパク質吸着量と初期細胞接着数の関係を示す．同図より，初期細胞接着数とタンパク質吸着量は正の相関関係にあることがわかる．

以上のことから，細胞初期接着性は，タンパク質吸着特性に依存していることが明らかとなった．このことは，基材表面のタンパク質吸着性をコントロールすることで，初期細胞接着性に優れた表面を作製することが可能となることを示唆している．

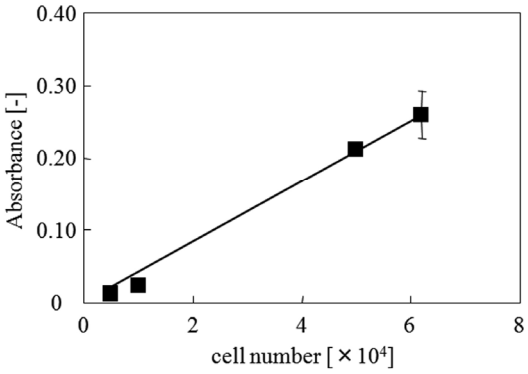


Fig.6 Relationship between value of MTT assay and cell number.

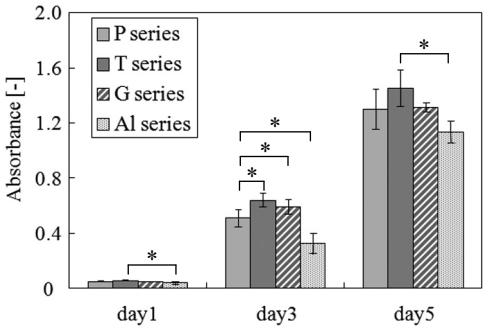


Fig.7 Amount of cell proliferation on the specimens (mean ± SD, n = 3, *: $p < 0.05$).

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers

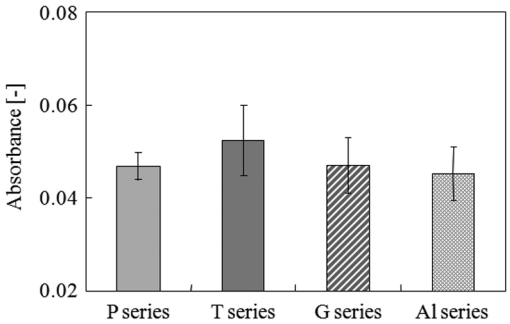
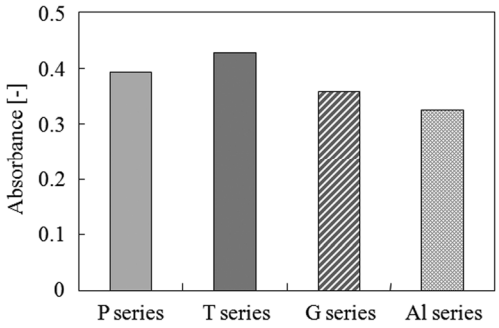


Fig.8 Amount of cell proliferation on the specimens after 6 h culture (mean ± SD, n = 3).



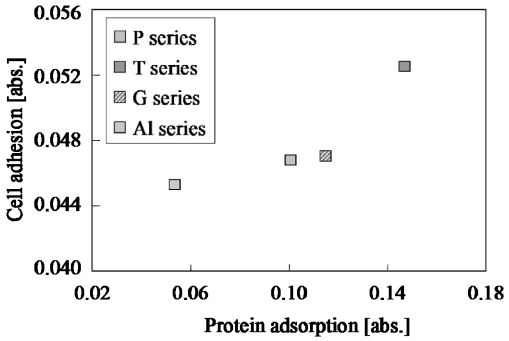


Fig.9 Amount of protein adsorption on the specimens after 24h. Fig.10 Relationships of cell adhesion and protein adsorption.

3・3 せん断応力を用いた細胞接着強度の評価

図 11 にせん断応力負荷後における接着細胞の割合を算出した結果を示す．同図より，流体を試験片上に流し表面にせん断応力を負荷させることによって，試験片表面上の細胞数が減少していることがわかる．また，負荷するせん断応力の増大に伴って，基材に残存する細胞数は減少する傾向が認められる．特に，鏡面研磨を施した P シリーズ上の細胞数が最も少ないことから，細胞が剥離しやすい表面であることがわかる．一方で，FPP 処理を施した基材上の細胞数は P シリーズと比較し多いことから細胞が剥離しにくい表面であることがわかる．これは，FPP 処理により形成された微視的な凹凸が，細胞接着を促進することを示唆するものである．

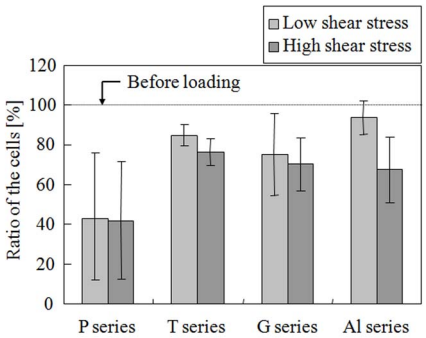


Fig.11 Amount of cells adhesion on the specimens after shear stress loading (mean±SD, n = 4).

3・4 細胞接着に及ぼす基材表面の微細凹凸形状の影響

初期細胞接着数および細胞接着強度が異なった要因について，細胞の接着機構の観点から検討を加えることとした．具体的には，細胞培養 24 h 後における基材表面を SEM により観察した．図 12 に細胞全体の観察像（図中の枠内）と接着部位の高倍率での観察像を示す．同図より，細胞全体の観察像に着目すると P リーズ，T シリーズ，G シリーズ上の細胞は良く伸展していることがわかる．一方，Al シリーズ上の細胞は，他と比較し伸展して

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers

いないことがわかる．L929 細胞は，接着していない状態では直径 5～8 μm の球状であることから，Al シリーズ上の細胞はほとんど伸展していないといえる．さらに，図 12d に示すように，Al シリーズ上の細胞膜表面には，無数の凹凸が存在していることがわかる．一方で，他のシリーズ上の細胞ではこのような細胞膜の凹凸は見られなかった．このことから，Al シリーズは，細胞が伸展しづらい表面であることがわかる．また，図 7 より，Al シリーズにおける細胞増殖性は低い値を示したことから，細胞伸展挙動と細胞増殖性の関係が確認された．

次に，細胞接着強度に及ぼす基材表面の微細凹凸形状について検討を加えるため，細胞と基材の界面での接着部位に着目して高倍率の SEM による詳細な観察を行った．その結果，全ての基材表面において細胞は複数の突起を形成して接着していることがわかった．さらに細胞と基材の接着部を観察すると，図 12a に示すように，P シリーズ上の細胞は，基材平面に対し突起との間に空隙が存在せず密接に接着し，伸展していることがわかる．一方，図 12b，図 12c，図 12d に示すように，T シリーズ，G シリーズ，Al シリーズ上の細胞は細胞表面の突起が立体的な構造をとり，基材と接着している．このことから，FPP 処理を施した基材表面上の細胞内部では，細胞骨格の形成が促進され細胞の強固な足場が形成されたものと推測される．

また，細胞が接着する際に形成した突起に注目すると，シリーズ毎にその伸展性に差が生じていることがわかる．とくに，T シリーズ上の細胞は，突起を無数に伸ばしている様子が観察される（図 12b 中の矢印）．一方で，Al シリーズ上の細胞は，突起をほとんど伸ばしていないことがわかる．

以上のことから，微粒子ピーニング処理によって培養基材表面の微細凹凸形状を変化させることで，L929 細胞の接着性，伸展挙動，増殖性を制御できる可能性が示唆された．しかしながら，微粒子ピーニング処理は基材表面の表面電位（ゼータ電位）に影響を与えていると考えられ，ゼータ電位の変化が細胞の挙動に影響は無視できない．今後，基材表面の微細凹凸といった幾何学的形状だけでなく，ゼータ電位，酸化皮膜厚さなど物理特性も検討することで微粒子ピーニングによる培養基材表面の制御技術を確立する必要がある．

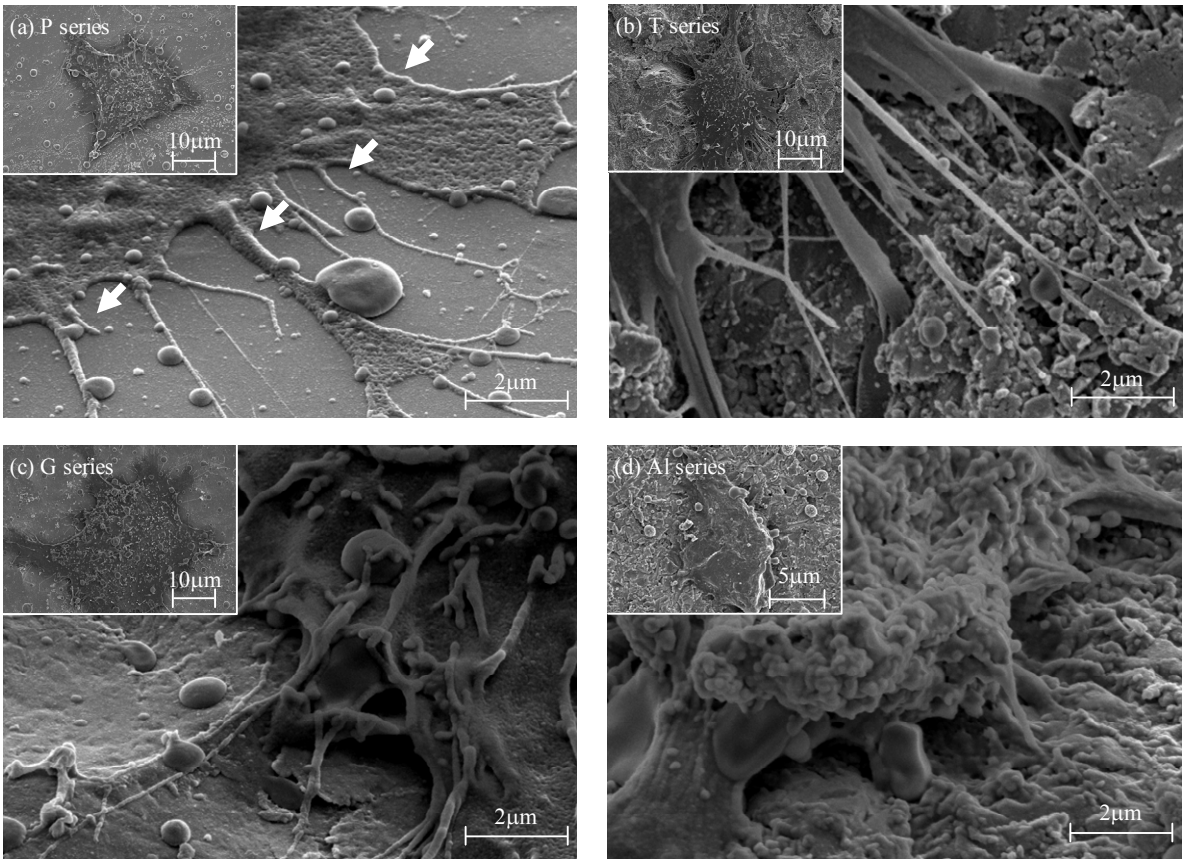


Fig.12 SEM observation of cells cultured on the specimens.

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers

4. 結論

本研究では，細胞増殖性に優れる表面を創製することを目的として，TiO_2，ガラス，Al_2O_3 粒子を用いた微粒子ピーニング（FPP）処理により Ti-6Al-4V 合金の表面の微細凹凸形状を変化させ，その表面上における細胞増殖性，接着性の評価を行った．その結果以下の事項が明らかとなった．

(1) FPP 処理を施した基材上における L929 線維芽細胞の増殖性は，鏡面研磨を施したものと比較し，変化した．とくに，TiO_2 粒子を用いて FPP 処理を施した基材上の細胞増殖性は，最も優れることが明らかとなった．これは，タンパク質の吸着性が他と比較し優れることで，細胞の初期接着性が高まったためと推測される．

(2) 基材に対する細胞の接着性を評価した結果，FPP 処理を施した表面上の細胞接着性は鏡面研磨を施したものと比較して向上した．これは，FPP 処理により形成させる微視的凹凸は，細胞接着強度に影響を及ぼすことを示すものである．

(3) 細胞が接着した基材上の SEM 観察を行った結果，シリーズ間によって細胞の伸展挙動に違いが生じることが明らかとなった．とくに，TiO_2 粒子を用いて FPP 処理を施した基材上の細胞は仮足を多数伸展させ，基材に接着していることが明らかとなった．一方，Al_2O_3 粒子を用いて FPP 処理を施した基材上の細胞は，仮足をほとんど伸展させないことが明らかとなった．

謝　　辞

本研究の一部は，科学技術振興機構（重点地域研究開発推進プログラム『地域ニーズ即応型』）の助成を受けて行われた．ここに謝意を表する．

文　　献

(1) Kunzler, T.P., Drobek, T., Schuler, M., and Spencer, N.D., *Biomaterials*, Vol. 28, No. 13 (2007), pp. 2175–2182.
(2) Jayaraman, M., Meyer, U., Buhner, M., Joos, U., and Wiesmann, H.P., *Biomaterials*, Vol. 25, No. 4 (2004), pp. 625–631.
(3) Zhao, G., Raines, A.l., Schwartz, Z., Boyan, B.D., *Biomaterials*, Vol. 28, No. 18 (2007), pp. 2821-2829.
(4) Kin, M., Kim, C., *Biomaterials*, Vol. 27, No. 32 (2006), pp. 5502-5511.
(5) Cai, K., Bossert, J., Jandt, K.D., *Colloids Surf. B*, Vol. 49, No. 2 (2006), pp. 136-144.
(6) Zinger, O., Landolt, D., *Biomaterials*, Vol. 26, No. 14 (2005), pp. 1837-1847.
(7) Spriano, S., Bronzoni, RONZONI M., Verne, E., Maina, G., Bergo, V., *Biomaterials*, Vol. 6, No. 11 (2005), pp. 1219-1229.
(8) Wieland, M., Hehroudi,EHROUDI B., Unette,NETTE D.M., , Xtor, M., *Biomaterials*, Vol. 26, No. 10 (2005), pp. 1119-1130.
(9) Zhu, X., Hen, J., Cheideler, L., Eichl, R., E-Gerstorfer, J., *Biomaterials*, Vol. 25, No. 18 (2004), pp. 4087-4103.
(10) Ziger, O., Andolt,NDOLT D., *Biomaterials*, Vol. 25, No. 14 (2004), pp. 695-2711.
(11) Mosmann, T., *J Immunol Methods*, Vol. 65, No. 1-2 (1983), pp. 55-63.
(12) 金属表面技術協会編，金属表面の計測技術（1985），日刊工業新聞社.
(13) van Wachem, P.B., Schakenraad, J.M., Feijen, J., Beugeling, T., van Aken W.G., Blaauw, E.H., Nieuwenhuis, P., Molenaar, I., *Biomaterials*, Vol. 10, No. 8 (1989), pp. 532-539.

©2011 The Japan Society of Mechanical Engineers