

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06823

研究課題名(和文)細胞接着・伸展性の高い細胞培養基板の創成と滅菌・表面改質の同時処理技術開発

研究課題名(英文)A novel cell culture dish with high cell adhesion and spread, and development of simultaneous treatment technology for sterilization and surface modification

研究代表者

岩森 暁 (Iwamori, Satoru)

東海大学・工学部・教授

研究者番号：90345603

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：紫外線(UV)ランプにより生成した活性酸素種(励起一重項酸素分子、酸素ラジカル、ヒドロキシラジカル)を用いた滅菌装置の開発で得た知見を基に、エネルギーの高いUVを通さない滅菌バッグの中でもポリスチレン(PS)製細胞培養基板の表面改質と滅菌が一工程で達成できるという低ダメージ表面改質技術について検討した。本研究では滅菌バッグ内で寿命の短い活性酸素の挙動とPS表面での反応、及びPS表面の官能基と細胞接着性の関係を調べると共に、細胞の接着・伸展により効果的な条件を見出すために、高湿度環境下での表面改質による親水性官能基の導入について検討し、細胞の接着・伸展に優れた細胞培養基板の創成に取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

気相中でUVの影響を除いた寿命の短い活性種と有機物の反応を解明することは高分子材料の表面改質のメカニズムを知る上でもその意義は大きい。また、不織布を用いて励起源であるUVの影響を除いた活性酸素種による表面改質技術は高分子材料に与えるダメージを抑えたこれまでにほとんど報告のない新しい技術である。

研究成果の概要(英文)：Based on studies in development of a new sterilization technology by using active oxygen species (excited singlet oxygen molecules, oxygen radicals, hydroxy radicals) generated under ultraviolet (UV) lamps, low damage surface modification technology for polystyrene (PS) cell culture dishes that allows surface modification and sterilization in sterilization bags is just developed to be achieved in a single process. In this study, behavior of active oxygen species, which has a short life, chemical reactions on the PS surface in a sterilization bag, relationship between functional groups and cell adhesion on the modified PS surface were investigated to find effective treatment conditions for cell adhesion and spreading. In addition, hydrophilic functional groups are introduced onto the PS dishes by the surface modification in a high humidity environment, and a cell culture dish with excellent cell adhesion and spreading was investigated.

研究分野：材料工学

キーワード：紫外線ランプ 活性酸素 ポリスチレン 細胞培養基板 表面改質 滅菌 細胞接着 細胞伸展

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プラズマを用いた表面処理技術は古くから産業に応用されており、最近では、大気圧中でプラズマ処理が可能な大気圧プラズマの技術が進歩し、産業界でも表面処理技術に利用されるようになってきている。一方で、プラズマ処理は大気圧プラズマを含めて、高エネルギープロセスであるため、材料表面に与えるダメージがしばしば問題となる。

波長 185nm と 254nm の紫外線 (UV) ランプにより生成した活性酸素種 (励起一重項酸素分子、酸素ラジカル、ヒドロキシラジカル) を用いた新しい滅菌装置の開発と微生物の滅菌メカニズムについて検討を行い、医療現場で使用している滅菌バッグを用いた医療デバイスの新たな低温酸素ガス滅菌技術の開発と滅菌メカニズムの解明、及び滅菌バッグ内での活性酸素のモニタリング技術に関する検討を行ってきた。滅菌バッグは紫外線などの高エネルギー線をほとんど透過せず気体のみを透過することができ、滅菌バッグを用いることで材料表面のダメージを極力低減した活性酸素種のみによる表面処理や滅菌が可能になる。

前述の活性酸素種は微生物の滅菌だけでなく高分子材料の表面改質技術にも応用することが可能であると考え、ポリスチレン (PS) 製の細胞培養基板の表面改質と滅菌が一工程で達成できるというコンセプトの有効性を確認した。

2. 研究の目的

本研究では、市販されている PS 製の細胞培養基板よりも高い細胞接着・伸展性を有する技術を創成しようとするものである。現在市販されている細胞培養基板は、特殊なプラズマ処理により細胞の接着性と伸展性を高めているが、細胞の接着性や伸展性には一定の分布がある。本システムにおいても市販品と同程度の細胞接着性・伸展性が確認されている。

本研究では滅菌バッグ内での活性酸素の挙動と PS 表面での反応、及び PS 表面の官能基と細胞接着性の関係を明らかにすると共に、細胞の接着・伸展により効果的な条件を見出す。高湿度環境下での表面改質によるヒドロキシル (OH) 基の導入や、アミノ基・ニトロ基の導入、メチル基の導入、及びそのバランスについて検討する。

3. 研究の方法

現在までに PS 製の細胞培養基板の表面改質と滅菌が一工程で達成できることは確認したものの、細胞の接着性は市販品と同程度であり、より細胞接着・伸展に効果的な改質技術が望まれる。表面改質に必要な活性種の生成と不織布内での活性種と PS 表面の反応を明らかにすることが必要である。

(1) 表面処理条件の検討：活性酸素処理における処理槽内の温度・湿度の影響、圧力の影響

活性酸素処理槽内の温度・湿度・圧力を変化させて、これらの因子が滅菌特性と PS 細胞培養基板の表面改質にどのような影響を与えるかについて検討を行う。

(2) 活性酸素の表面作用量の計測と、滅菌バッグ内での化学反応の解明

電子スピン共鳴 (ESR) と色素インジケータによって、不織布内に存在する活性酸素種の計測手法を見出してきた。励起一重項酸素分子 (1O_2) と OH ラジカルはスピントラップ剤 (それぞれ TEMP と CYPMP0) によってトラップして安定なラジカルを生成させ、ESR により計測する。不織布を用いて減圧環境下で行う ESR 計測では、スピントラップ剤を溶液に溶かしたものをそのまま使用することはできない。 1O_2 をスピントラップ剤と水溶性高分子によってゲル化し、定量的に ESR 計測できることを実証しており、本研究でもこの手法を用いて活性酸素を計測する。

また、OH ラジカルは塩基性色素であるメチレンブルー (MB) をナフィオンやプルランといった高分子材料を用いて薄膜化することにより、不織布内でオゾンや 1O_2 とほとんど反応せず、OH シルラジカルに特異的に反応する色素インジケータを開発してきた。本研究でもこの手法を用いて不織布内での OH ラジカルの濃度や表面採用量を推定する。このほかに XPS、NMR、FT-IR などにより OH ラジカルや添加ガスに伴う活性種が MB や高分子に及ぼす分解挙動についても検討し、滅菌バッグ内での活性種と PS の反応メカニズムを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 表面処理条件の検討

(1-1) 活性酸素処理における各種パラメータの影響

ポリスチレン (PS) 製細胞培養基板に対する活性酸素曝露による表面改質効果の向上を目指し、活性酸素生成源である紫外線ランプとの距離が活性酸素生成および表面改質効果に与える影響を調査した。さらに、活性酸素曝露によって処理されたポリスチレン表面と、酸素プラズマ照射が施された市販品の表面特性を比較し、細胞接着性向上に関わる表面特性を考察した。その結果、紫外線ランプとの距離を近づけることによって紫外線照度が上昇し (図 1)、活性酸素濃度が増加することによって表面改質効果が向上することがわかった (図 2 および図 3)。また、細胞培養試験を行った結果、untreated 上の細胞はどれも細長い形状であるのに対し、基板との距離 140 mm では伸展した細胞が増加したが一部 untreated のような線形化した細胞が確認された。また 100 mm と 70 mm では線形化した細胞が見られず、比較である市販品 (TCPS) に近い形状であることが分かった (図 4)。つまり未処理の PS 製細胞培養基板と比較して良好に細胞が接着し、市販品と同様に細胞が接着することが示された。

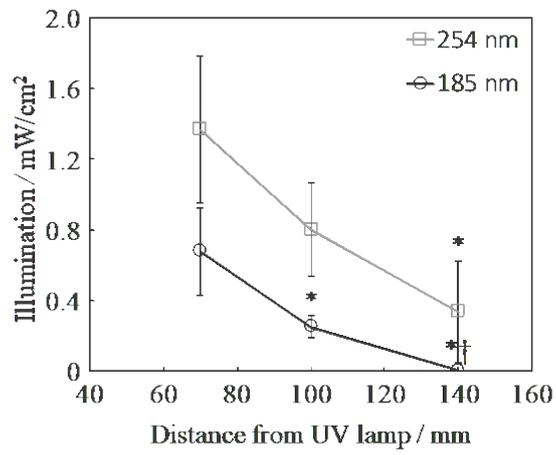


図1 紫外線ランプとPS基板表面間の距離と波長185 nmおよび254 nmの紫外線の照度の関係

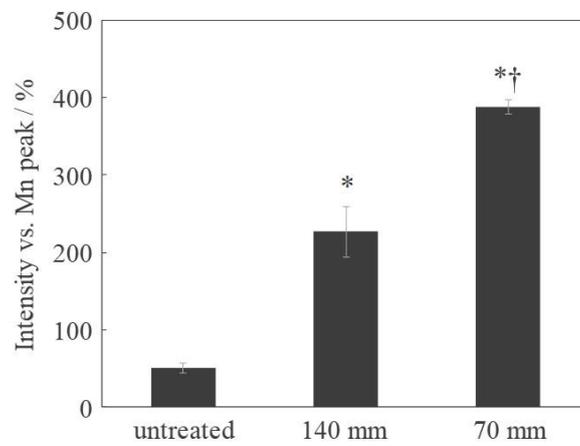


図2 紫外線ランプからの距離70 mmと140 mmにおける活性酸素曝露量 (ESR測定による)

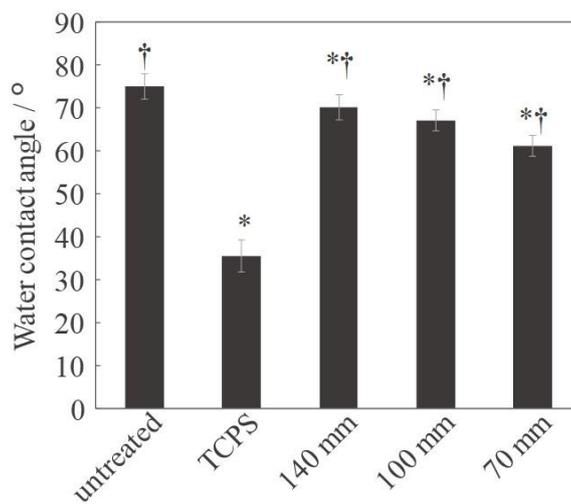


図3 紫外線ランプからの距離とPS表面における水の接触角の関係

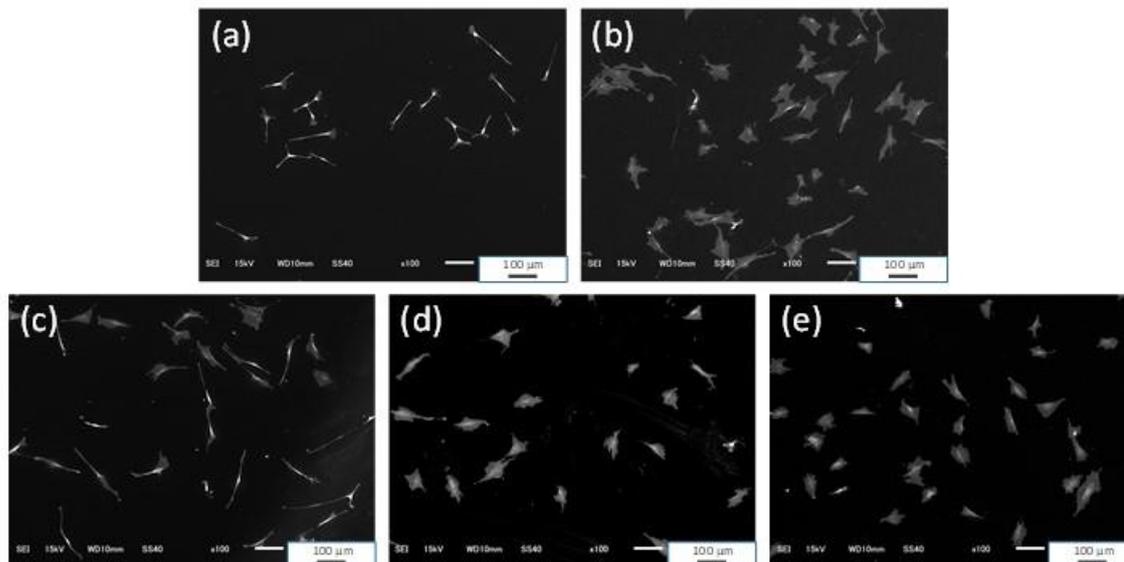


図4 表面処理したPS表面上に播種したMC3T3-E1の24時間培養後のSEM像。(a)untreated, (b)TCPS, (c)20min, (d)40min, (e)60min. Scale bar: 100 μm.

(1-2) 添加ガスの影響

比較的毒性の低いアンモニアを用いてポリスチレン表面に窒素系の親水基の導入による親水性の表面改質を試みた。ポリスチレン表面はアンモニアと酸素ガスの導入により生成した活性酸素による処理後には窒素系官能基がわずかではあるが付与され、表面の親水化が進んだ(水の接触角は数%低下)。

本処理後にMC3T3-E1の培養を行った。培養48時間後に撮影したMC3T3-E1細胞の位相差顕微鏡像を図5に示す。図5(a)の未処理PSでは細胞が線形化し、接着性・進展性が乏しい。図5(b) TCPS、(c) AOSは接着性が良好であることに対して、図5(d) AOS-NH₃-8500ppm、(e) AOS-NH₃-30000ppmの条件下では細胞を播種してから48時間後、細胞の剥離が生じた。すなわち、細胞を播種した初期の段階での細胞接着は良好であったが、その後細胞は剥離したことから、本研究で付与した窒素系官能基は必ずしも細胞接着に良好ではないことが分かった。

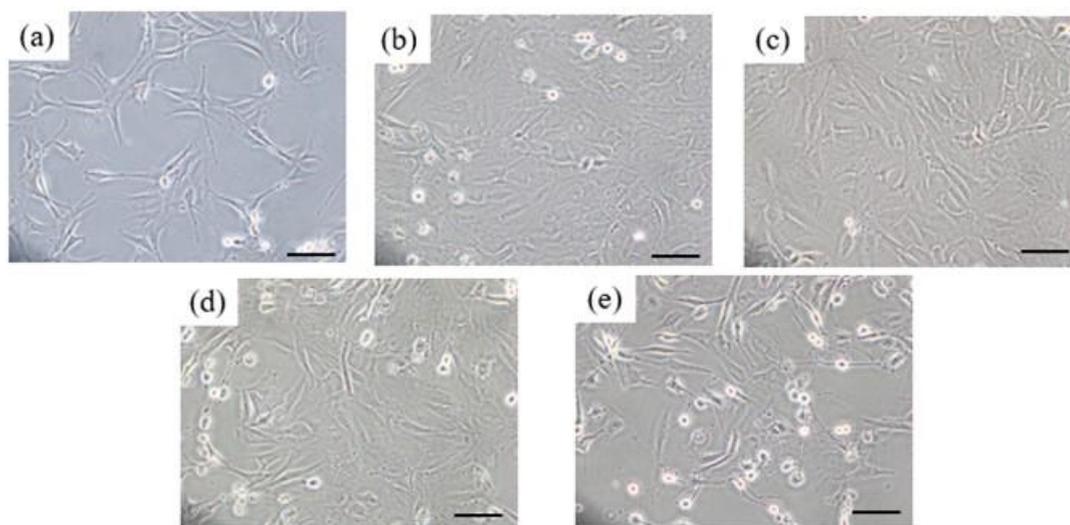


図5 培養48時間のMC3T3-E1細胞の顕微鏡写真
 ((a) 未処理, (b) TCPS, (c) AOS, (d) AOS-NH₃-8500 ppm, (e) AOS-NH₃-30000 ppm, scale bar; 100 μm)

(2) 活性酸素の表面作用量の計測と、滅菌バッグ内での化学反応の解明

(2-1) 滅菌バッグ内での活性酸素の表面作用量の計測

電子スピン共鳴 (ESR) と色素インジケータによって、不織布内に存在する活性酸素種の計測手法を見出してきた。励起一重項酸素分子 (¹O₂) とOHラジカルはスピントラップ剤によってト

ラップして ESR により計測した。減圧環境でも測定できるようにするため、従来は水溶性高分子であるポリビニルアルコール PVA を使用してスピントラップ材と共にゲル化して用いたが、より酸素透過度の高いヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) とスピントラップ材を混合して膜化し、活性酸素インジケータを作製した。HPMC を用いることで、検出感度が向上した (図 6)。また、 $^{1}O_2$ の寿命は従来報告されているものと比べて長い可能性が示唆された。

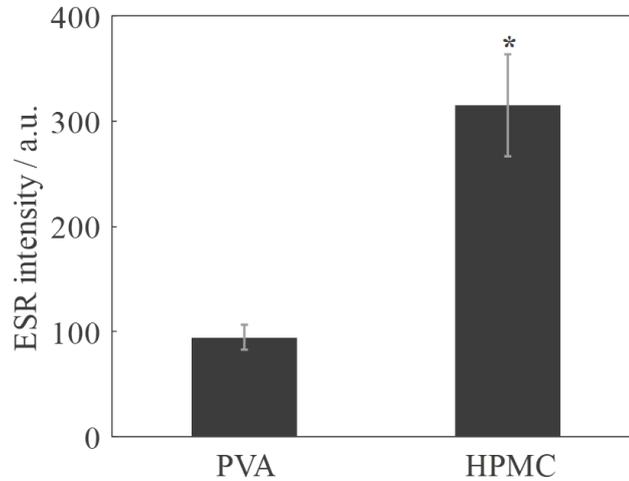


図 6 膜化材料 (PVA と HPMC) により作製した薄膜インジケータを用いて計測した ESR 強度 (* $P < 0.05$ vs PVA. mean \pm SD; $n = 3$).

(2-2) 滅菌バッグ内での OH ラジカル生成反応

滅菌バッグ内で起こる化学反応のモデルを構築すると共に、従来技術との差異を明確にする。メチレンブルー薄膜とスピントラップ法を用いて、不織布内の活性酸素の分布をモニタリングする手法として 1 面が解放されているアルミニウム製の直方体容器で解放されている面を不織布で覆った試験容器 (テストボックス) を試作した (図 7)。不織布面に対して平行に 3 段のトレイを設置し、それぞれのトレイに色素インジケータ薄膜やスピントラップ剤含有の水溶性高分子薄膜を 3 段に設置し、不織布からの距離の違いにより色素インジケータの脱色程度と ESR による活性酸素のトラップ率から OH* の濃度分布と不織布内での OH* の生成メカニズムについて考察した。図 7 にはメチレンブルー色素インジケータを用いて、高湿度下 (OH ラジカルが多く生成) で処理をした結果である。各段共に脱色反応が起こっていることから OH ラジカルはボックス内部に存在していることが分かった。活性酸素種の一つで、不織布外で生成した比較的長寿命であるオゾンが不織布を通り内部にまで拡散し、不織布内部に存在する水分子と反応することで不織布内に OH* が生成したものと推測された。

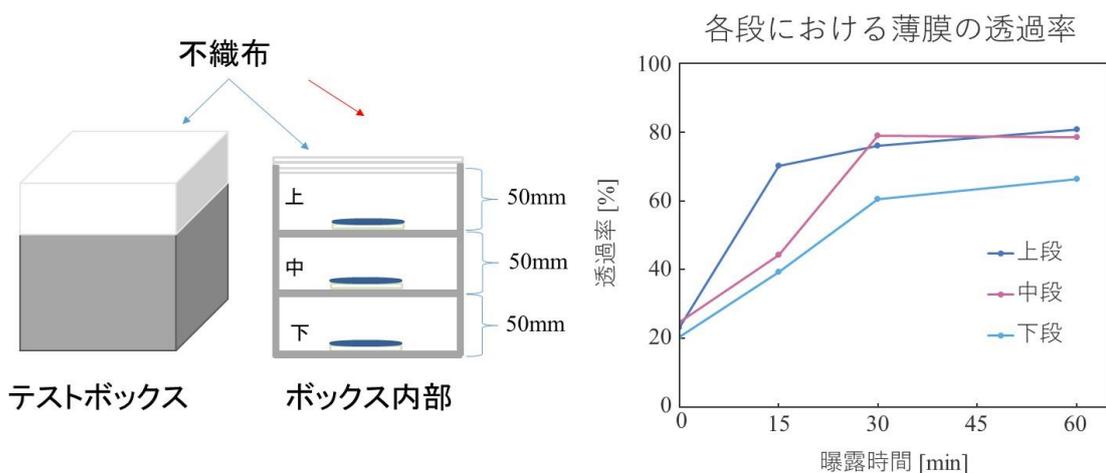


図 7 OH ラジカル検知のための試験容器の構造と色素インジケータの脱色反応

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 細谷和輝, 高橋一成, 大家溪, 岩森暁	4. 巻 84
2. 論文標題 活性酸素種による表面改質におよぼす紫外線ランプとポリスチレン製細胞培養基板との距離の影響	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本機械学会論文集	6. 最初と最後の頁 17-00561
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1299/transjsme.17-00561	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuki Hosoya, Saranya Yenचित, Yuta Tadokoro, Kei Oya, Satoru Iwamori	4. 巻 47
2. 論文標題 Improved Singlet Oxygen Detection Sensitivity in Electron Spin Resonance Using a Spin-trap Agent Incorporated into a Water-soluble Polymer Film	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 1191 ~ 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1246/cl.180488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Saranya Yenचित, Hiromi Yamanaka, Pasika Temeeprasertkij, Yoshiki Oda, Osamu Kanie, Yosuke Okamura, Toshiyuki Inazu, Satoru Iwamori	4. 巻 59
2. 論文標題 Chemical stability of a colorimetric indicator based on sodium alginate thin film and methylene blue dye upon active oxygen species exposure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SDDF09
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://iopscience.iop.org/article/10.7567/1347-4065/ab6340	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kazuki Hosoya, Kei Oya, Satoru Iwamori	4. 巻 49
2. 論文標題 Depth Direction Analysis of Polystyrene Surface Modified by Active Oxygen Species Generated by Ultraviolet Irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 350 ~ 353
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1246/cl.190904	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yenchit Saranya, Tadokoro Yuta, Iwamori Satoru	4. 巻 139
2. 論文標題 Measuring Active Oxygen Species Across a Nonwoven Fabric Using a Pullulan-mixed Methylene Blue Thin Film and Electron Spin Resonance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 54 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1541/ieejsmas.139.54	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hosoya Kazuki, Takahashi Kazunari, Oya Kei, Iwamori Satoru	4. 巻 148
2. 論文標題 Simultaneous process of surface modification and sterilization for polystyrene dish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Vacuum	6. 最初と最後の頁 69 ~ 77
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.vacuum.2017.10.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Saranya Yenchit, Satoru Iwamori
2. 発表標題 Analyses of two colorimetric indicators for detection of hydroxyl radicals in atmosphere by using methylene blue dye
3. 学会等名 4th Japan-Thailand Joint Symposium on Advanced Nanomaterials and Devices for Electronics and Photonics (JT-AND 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Pasika Temeeprasertkij, Saranya Yenchit, Michio Iwaoka, Satoru Iwamori
2. 発表標題 Interactions between Methylene Blue and Pullulan by Molecular Orbital Calculations
3. 学会等名 4th Japan-Thailand Joint Symposium on Advanced Nanomaterials and Devices for Electronics and Photonics (JT-AND 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hitoshi Miyazaki, Kazuki Hosoya, Kazunari Takahashi, Satoru Iwamori
2. 発表標題 Surface Modification of Polystyrene in Ammonia Environment with Ultraviolet Light Irradiation
3. 学会等名 Joint Symposium between Sister Universities (JSSUME2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuki Hosoya, Yenchit Saranya, Yuta Tadokoro, Satoru Iwamori
2. 発表標題 Detection sensitivity of excited singlet oxygen molecule under vacuum condition by using spin trap agent incorporated water-soluble polymer films
3. 学会等名 5th International Conference on Advanced Materials (IUMRS-ICAM 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yenchit SARANYA, Yuta TADOKORO, Yoshiki ODA, Satoru IWAMORI
2. 発表標題 Chemical interaction between methylene blue dye and pullulan used for detection indicator of hydroxyl radicals
3. 学会等名 3rd Japan-Thailand Joint Symposium on Advanced Nanomaterials and Devices for Electronics and Photonics (JT-AND 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考