

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06586

研究課題名(和文)細胞パターン培養に向けたプラズマ処理によるナノファイバパターンニング技術の開発

研究課題名(英文)Patterned Nanofibers for cell culture by plasma treatment

研究代表者

前田 知貴 (Maeda, Tomoki)

慶應義塾大学・理工学部(矢上)・助教

研究者番号：00754730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プラズマ処理を用いて、ナノファイバをパターンニングする技術を開発した。さらに、パターンニングされたナノファイバシートを用いた細胞のパターン培養の可能性を検討した。具体的には、プラズマ処理において、マスクを用いることで、プラズマ処理面および未処理面を同一基板内に得た。そのPDMS基板に対して、ナノファイバを紡糸したところ、ナノファイバはプラズマ処理面に選択的に付着し、パターンニングされたナノファイバシートを得た。プラズマ処理条件およびナノファイバ紡糸時の環境条件の最適化により、パターンニング精度が向上した。さらに、ナノファイバシート上で細胞パターン培養に成功した。

研究成果の概要(英文)：In this study, the patterning method of electrospun nanofibers by plasma treatment was developed. Additionally, the cell culture on the patterned nanofibers was examined. The PDMS surface was partially modified by using a mask during the plasma treatment. Then, the nanofibers were spun using the treated PDMS as a collector. As a result, the patterned nanofibers were obtained on the PDMS substrate. By adjusting the condition of plasma treatment and electrospinning, the patterned area became clearer. Furthermore, cells were cultured on the patterned nanofibers. As a result, the cell proliferation was enhanced on the patterned nanofibers as compared to the untreated surface.

研究分野：ポリマ材料

キーワード：ナノファイバ エレクトロスピニング法 パターンニング 表面改質 プラズマ処理

1. 研究開始当初の背景

再生医療の実用化に向けた生体材料工学の研究において、生体内の組織を体外に模擬形成するための基板およびその作製技術が求められている。生体内の組織を構成する細胞は、増殖・分化することで、機能性を発現する。これらの現象は、複数種の細胞が接触し物質交換することによって生じる。このような細胞間の物質交換を詳細に研究すること、また、体外において組織形成が可能な基板を開発することが、実用化に向けて重要である。

このニーズに対して、複数の細胞を同一基板上で共培養する「細胞パターンニング培養技術」が研究されてきた。この「細胞パターンニング培養技術」には、細胞が混ざり合わず、かつ互いに物質交換できる条件が達成される必要がある。実際に、化学的に材料表面の親水・疎水性を制御する方法^[1]、物理的にマスクを用いて細胞接着を阻害する方法^[2]など、2次元平面上での細胞パターンニング培養技術が多く報告されている。しかし、生体内は3次元的事であること、また、3次元的に培養された細胞は2次元的に培養された細胞と比べて、細胞の機能性が異なること^[3]から、組織を構成する細胞間の相互現象をさらに詳しく解明するためには、生体内を模擬した3次元細胞パターンニング培養基板上で細胞培養する技術が求められている。

3次元的に細胞パターンニング培養を実現するために、エレクトロスピンニング(ES)法により作製されたポリマナノファイバシートが近年着目されている。ES法とは、ポリマー溶液に約10 kVという高電圧を印加しポリマーを微細化する手法であり、2000年代初頭までに、300 nm以下の極めて微細な径を有するナノファイバの作製が各種ポリマー材料について報告されている。このナノファイバの積層体は、ポリマー材料自身が有する柔軟性に加えて、多孔性・高比表面積・高さ方向の厚みを有する3次元の不織布となる。

このES法を用いた「細胞パターンニング培養技術」の基礎技術となるナノファイバのパターンニングに関して、数件報告がある。具体的には、ファイバ紡糸速度に比べ大きな速度で基板を水平方向に移動させることにより、ファイバが積層する領域の制御に成功している。また、導体・絶縁体の複合基板を用いることにより、ファイバ積層部分のパターンニングを可能にしている^[4]。しかし、どの方法においても、精密工作機やマイクロ表面加工等の高度な技術を利用したものが多く、実用上の課題が多く残されている。

申請者は、これまでに「プラズマ処理によるポリマー材料の表面改質」、「細胞適合性ポリマーによるナノファイバ作製」を進めてきた。また、予備実験において、プラズマ処理を施した基板に対して、ES法によりナノファイバを紡糸したところ、単一基板内でナノファイバ付着部分と非付着部分を作製でき、ナノファイバパターンニングを達成できた。具体的

には、部分的にマスクされた基板に対して、酸素プラズマ処理を施した。その基板にナノファイバを紡糸したところ、プラズマ処理面にナノファイバが選択的に付着した。

酸素プラズマ処理は、細胞培養基板の滅菌にも使用されており、数ある滅菌手法の中でも、特に強い滅菌性・安全性を有している。また、これまで主流とされてきた蒸気滅菌(処理時間:30分、温度:121℃)と比較すると、 O_2 プラズマ処理は、処理時間15秒、温度60℃以下と、短時間・低温の工程で同程度の滅菌をすることができる。

以上より、 O_2 プラズマ処理は、ナノファイバパターンニングと滅菌処理を同時に達成できる手法であり、3次元細胞パターンニングに向けて有用な手法である点に注目した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、滅菌効果を有するプラズマ処理を利用したナノファイバパターンニング技術の確立と、3次元細胞パターンニングへの応用可能性の検討とした。具体的には、ナノファイバパターンニングのためにプラズマ処理条件などのパラメータの条件を最適化した。さらに、実用を考え、マイクロレベルでのナノファイバパターンニング精度を検証した。また、パターンニングされたナノファイバシート上で単一の細胞培養を実施し、細胞増殖性を評価した。

3. 研究の方法

(1) 試験材料

生体適合性を有し、ES法によるナノファイバ化が可能なポリマ材料であるポリビニルアルコール(PVA)、ポリ乳酸(PLA)を用いた。また、基板材料には、細胞培養足場として使用実績のあるポリジメチルシロキサン(PDMS)を用いた。

(2) ナノファイバパターンニング

PDMSマスクをPDMS基板の一部に付着させ、プラズマ処理を実施した。その後、PDMSマスクを除去した。PDMSマスクはプラズマ処理効果を遮蔽するため、プラズマ処理をパターンニングすることが可能である。プラズマ処理を施した面をプラズマ処理面、プラズマ効果を遮蔽した面を未処理面とした(図1a)。このとき、プラズマ処理に用いるガス種(酸素、窒素、アルゴン)を変更した。また、出力を20~200 Wの範囲で変化させた。

このプラズマ処理したPDMS基板に対して、ES法を用いてナノファイバを紡糸した(図1b)。このとき、湿度を20%RH~60%RHの範囲で制御した。

(3) 細胞パターンニング

パターンニングされたナノファイバシート上で、内皮細胞培養試験を実施した。培養した細胞を観察し、細胞数を測定した。

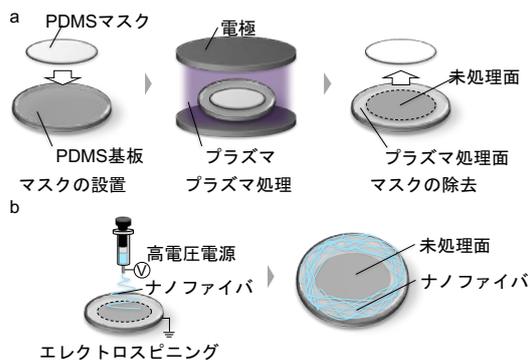


図1 PDMS基板へのプラズマ処理 (a) とナノファイバパターンニング (b)

4. 研究成果

(1) ナノファイバパターンニング

① 湿度の影響

図2に、湿度を変化させてナノファイバを紡糸したナノファイバパターンニングの画像およびSEM画像を示した。このとき、プラズマ処理には、酸素を用いた。処理条件は、出力200 W、処理時間60 sとした。

図2a~cより、湿度の上昇にともない、プラズマ処理面(基板外側)が白くなった。このことから、湿度の上昇にともない、プラズマ処理面へのナノファイバ付着量が増加したと考えられる。

ナノファイバが付着したプラズマ処理面のSEM画像が図2g~iである。PVAナノファイバの直径は約260 nmであった。湿度上昇にともない、ナノファイバ付着量が増加していることが明らかとなった。一方で、未処理面は、湿度に関わらず、ナノファイバ付着量は変化がなかった(図2d~f)。

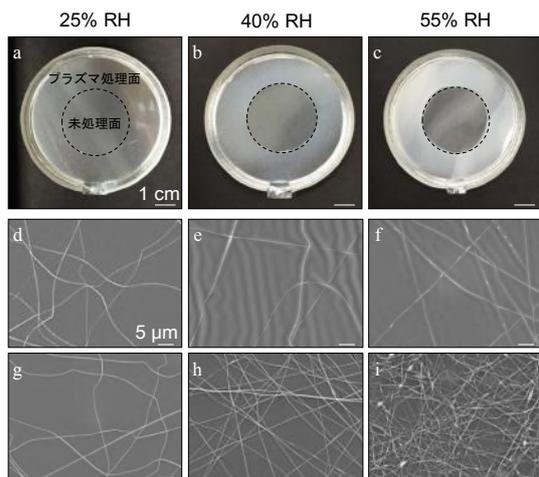


図2 異なる湿度でのPDMS基板へのナノファイバ紡糸, (a) 25%RH, 基板全体, (b) 40%RH, 基板全体, (c) 55%RH, 基板全体, (d) 25%RH, 未処理面, (e) 40%RH, 未処理面, (f) 55%RH, 未処理面, (g) 25%RH, プラズマ処理面, (h) 40%RH, プラズマ処理面, (i) 55%RH, プラズマ処理面

SEM画像からナノファイバ付着量を算出した結果を図3に示した。図3より、未処理面では湿度の上昇によらず付着量は一定だったのに対し、プラズマ処理面では湿度上昇にともない付着量が増加することが定量的に明らかになった。さらに、湿度が60%RHのとき、プラズマ処理面と未処理面の付着量の差が最大となり、プラズマ処理面の付着量は、未処理面の付着量の約10.4倍であった。

湿度の上昇にともないプラズマ処理面のナノファイバ付着量が増加した原因を考察するために、PDMS基板の表面抵抗率を測定した。図4より、湿度に関わらず、未処理面の表面抵抗率は変化しなかったのに対し、プラズマ処理面の表面抵抗率は、湿度の上昇にともない、低下した。具体的には、60%RHにおいて、未処理面の表面抵抗率は $9.2 \times 10^{16} \Omega$ であったのに対し、プラズマ処理面の表面抵抗率は $8.6 \times 10^{11} \Omega$ であった。

先行研究において、プラズマ処理により、ポリプロピレン基板が親水化され、その親水性表面に大気中の水分が吸着したことで、表面抵抗率が低下したという報告がある^[5]。本研究においても同様に、プラズマ処理により、PDMS基板が親水化され、大気中の水分が吸着することで、表面抵抗率が低下したと考えられる。また、高湿度下においては、吸着する水分量が多くなり、表面抵抗率の低下が顕著であったと考えられる。このような表面抵抗率の低下により、ES時にプラズマ処理面のみがアースされることで、電位の低いプラズマ処理面へ、帯電したナノファイバが選択的に付着したと考えられる。

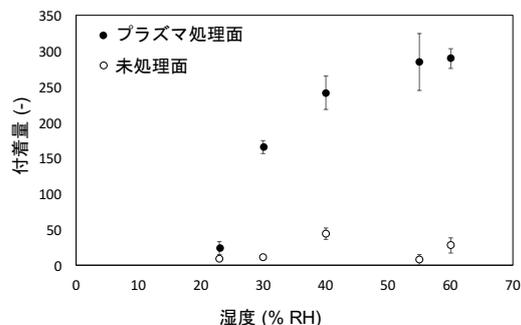


図3 湿度のナノファイバ付着量の関係

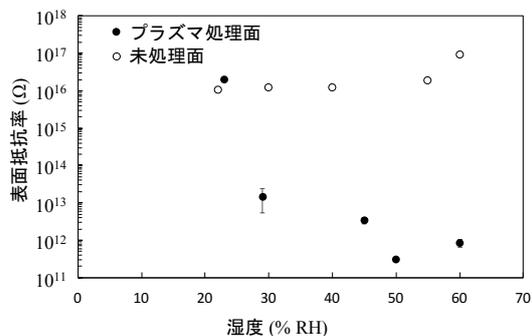


図4 湿度と表面抵抗率の関係

② ガス種の影響

プラズマ処理のガス種を変化させ、PDMS 基板上のナノファイバ付着量を算出した (図 5 に)。酸素に比べ、アルゴンならびに窒素を用いたプラズマ処理では、ナノファイバ付着量が少なかった。

①と同様に、異なるガスを用いてプラズマ処理を実施した PDMS 基板の表面抵抗率を測定した (図 6)。湿度は、50%RH に設定した。未処理面の表面抵抗率 ($1.8 \times 10^{16} \Omega$) と比較すると、プラズマ処理面の表面抵抗率は大きく低下し、窒素を用いたプラズマ処理面の表面抵抗率が最も小さかった ($3.1 \times 10^{11} \Omega$)。

③ 処理面サイズの影響

マイクロスケールのプラズマ処理面へのナノファイバパターンニングを試みた。湿度を 50%RH に設定した。また、プラズマ処理には窒素を用い、出力 200 W、処理時間 60 s とした。図 7a に線状プラズマ処理面 (幅 400 μm) へのナノファイバパターンニングを、図 7b に格子状プラズマ処理面 (幅 3 mm) へのナノファイバパターンニングを示した。図 7a、b より、任意の形状のプラズマ処理面へのナノファイバパターンニングが確認できた。

ナノファイバパターンニングにおけるナノファイバの積層状態を評価するために、レーザー顕微鏡による観察を実施した。図 7c より、幅 400 μm にナノファイバが堆積し、その高さは最大で 98 μm であった。また、格子右上部分を観察することで、図 7d より、堆積したナノファイバの高さは 96 μm 程度であることが確認できた。

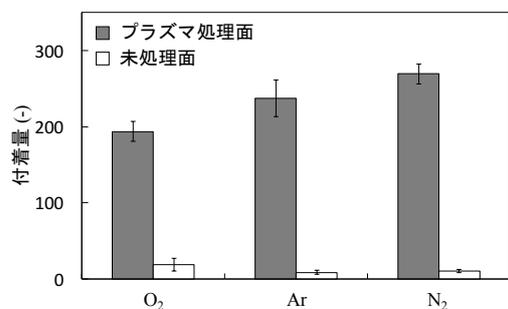


図 5 ガス種とナノファイバ付着量の関係

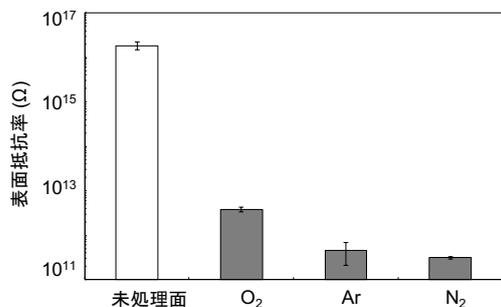


図 6 ガス種と表面抵抗率の関係

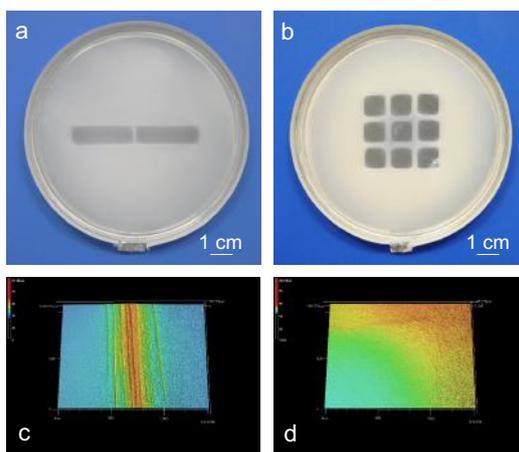


図 7 ナノファイバパターンニング (a) 線状 (幅 400 μm)、(b) 格子状 (幅 3 mm)

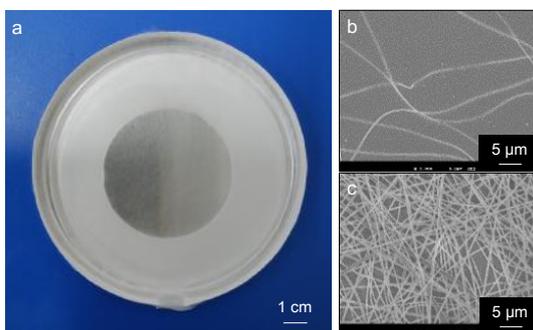


図 8 パターンニングされた PLA ナノファイバシート(a)とその SEM 画像 (b)未処理面、(c)プラズマ処理面

④ ナノファイバの材質の影響

PVA の代わりに、PLA を用いて、ナノファイバパターンニングを実施した。湿度を 60%RH に設定した。プラズマ処理には、窒素を用い、出力 200 W、処理時間 60 s とした。図 8 より、ナノファイバの材質に関わらず、プラズマ処理面にのみ選択的に PLA ナノファイバが付着した。また、PLA ナノファイバの直径を測定した結果、直径 250~500 nm であり、平均直径が 416 nm であることがわかった。

(2) 細胞パターン培養

パターンニングされた PLA ナノファイバシートを用いて、細胞パターン培養を実施した。図 9 に蛍光顕微鏡による観察結果を示す。6 日後において、未処理面では細胞が増殖していない (図 9a~c)。一方で、パターンニングされた PLA ナノファイバシート上では細胞が増殖した (図 9d~f)。このことは、細胞数をからも定量的に示された (図 10)。具体的には、PLA ナノファイバシート上の細胞数は、未処理面の細胞数の 23 倍まで向上した。

さらに、PLA ナノファイバシートと未処理面の境界を観察した (図 11)。PLA ナノファイバシート上のみ細胞が増殖していることから、細胞パターン培養が可能であることが明らかとなった。

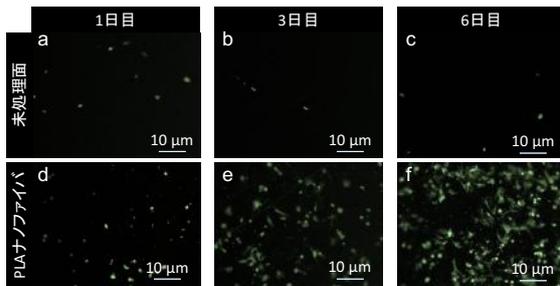


図9 細胞パターン培養：未処理面 (a) 1日目、(b) 3日目、(c) 6日目、およびPLA ナノファイバシート (d) 1日目、(e) 3日目、(f) 6日目

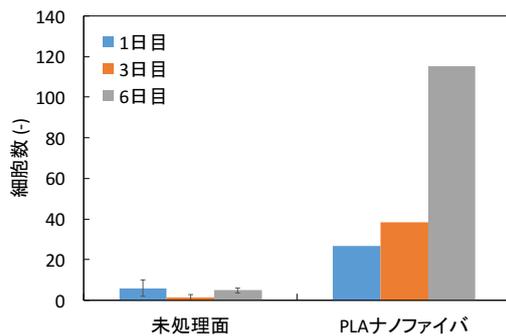


図10 細胞増殖性の変化

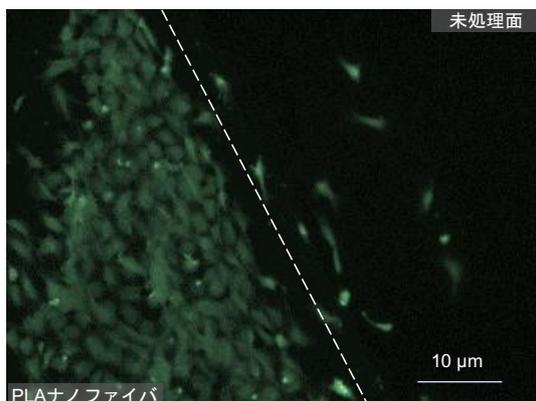


図11 PLA ナノファイバシートと未処理面の境界

以上のように、プラズマ処理を用いたナノファイバパターンニング技術が確立され、細胞パターン培養が可能であることが示された。細胞培養基板の滅菌にも使用されているプラズマ処理を用いたナノファイバパターンニングは初めての試みであり、先行研究の化学的方法と比較しても、簡易、安全である。

今後の展望としては、ナノファイバシートのモルフォロジーを、各種細胞の培養に適した条件へと最適化する技術を探る必要がある。

<引用文献>

- ① A. N. Efremov et al., *Biomaterials*, 34, pp. 1757-1763 (2013)
- ② D. Wright et al., *The Royal Society of Chemistry*, 7, pp. 1272-1279 (2007)
- ③ Y. Liu et al., *Biomacromolecules*, 15, pp. 1044-1054 (2014)
- ④ D. Li, et al., *Nano Letter*, 5, pp. 913-916 (2005)
- ⑤ L. Kravets et al., *Plasma Processes and Polymers.*, 10, pp. 603-618 (2013)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① T. Maeda, K. Takaesu, and A. Hotta, Syndiotactic polypropylene nanofibers obtained from solution electrospinning process at ambient temperature, *Journal of Applied Polymer Science*, 査読有, Vol.133, 2015, 43238. DOI:10.1002/app.43238
- ② M. Miyazaki, T. Maeda, A. Hotta et al., PEG-based nanocomposite hydrogel: Thermoresponsive sol-gel transition controlled by PLGA-PEG-PLGA molecular weight and solute concentration, *Polymer*, 査読有, Vol.115, 2017, pp246-254.

[学会発表] (計13件)

- ① T. Maeda, N. Kurokawa, M. Nakadoi, Y. Ishii, N. Kobayashi, and A. Hotta, Electrospun PVA-nanofiber patterning on a PDMS substrate by O₂ plasma treatment, 14th Pacific Polymer Conference, 2015年12月11日, Hawaii (USA).

[図書] (計5件)

- ① 前田 知貴、堀田 篤、技術情報協会、ポリプロピレンの構造制御と複合化、成型加工技術、2016、6 (319-324) .
- ② N. Kurokawa, F. Endo, T. Maeda, A. Hotta, Elsevier, *Nanostructures for Novel Therapy*, 2017, 25 (201-225).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 知貴 (MAEDA, Tomoki)
 慶應義塾大学・理工学部・助教
 研究者番号：00754730