

人工細胞壁の肝実質細胞培養基質としての有用性の評価

森林資源科学講座 森林化学分野

田崎 裕佳

[諸言] 当研究室では、木材細胞壁を模倣した人工細胞壁の創製し、細胞壁機能の解明と新規機能性材料としての利用を目指している。本研究では、その利用研究の一環として、ハニカムパターン化セルロースフィルムにヘミセルロースの一つであるアラビノガラクトサン(AG)を吸着させた人工細胞壁を調製し、肝実質細胞培養基質として有用性を検討した。

[実験] ハニカムパターン化再生セルロースフィルム(HRC)の調製: 既報¹⁾に従い、ハニカムパターン化ポリカプロラクトンフィルムを第一鋳型とし、ポリジメチルシロキサン(PDMS)で転写することで第二鋳型を調製し、第二鋳型をセルロースアセテートのアセトン溶液で転写し、脱アセチルカすることにより HRC を調製した。また、第一鋳型に孔の深いハニカム構造を持つシリコン基板(東北大学下村研提供)を用い、同様の方法で孔の深い HRC を調製した。ハニカムパターン化バクテリアセルロースフィルム(HBC)の調製: 前述のシリコン基板を第一鋳型として、PDMS を用いる転写を繰り返して、第二、第三鋳型を調製した。さらに、第三鋳型を寒天培地で転写することにより、ハニカムパターン化寒天フィルムを調製した。この培地上に酢酸菌 ATCC53582 株を接種し、HBC を調製した。AG 吸着: HRC および、HBC に AG の水溶液を流涎して、AG 吸着フィルムを調製した。また、AG の吸着を強固にするため、高崎量子応用研究所の協力のもと電子線の照射を行った。肝実質細胞培養: SD-ラットの肝実質細胞を bio coat collagen1 dish 35mm (コスモ・バイオ株式会社)及び人工細胞壁に播種し、37 °C、5 % CO₂ 濃度インキュベータで培養した。3 日間培養後、Cell-counting kit-8(同仁化学)を用いて生細胞数を見積もり、bio coat collagen1 dish の生細胞数に対する百分率で生細胞数を評価した。

[結果と考察] HRC への AG 吸着の効果: 生細胞の割合の測定した結果、AG を吸着させた HRC の方が低い値となった。これは、AG の吸着が弱く、培養過程で AG が多量に流出したためと考えられる。電子線照射をした HRC で生細胞の割合が向上し、AG の吸着が強固になった可能性が示された。HRC の孔径の違いによる比較: 孔径 5 µm の HRC は孔径 20 µm の HRC よりも細胞の接着が良かった。また、孔径 5 µm の HRC では、スフェロイドが形成おり、肝機能の発現の可能性があった。一方で、孔径 20 µm の HRC では、ハニカムの孔に細胞をはめ込んだセルチップの作成を目指したが、はまり込んでいる細胞はわずかであり、細胞の動きを制御することができなかった。HBC への AG 吸着の効果: HRC の結果から、多量の AG の溶脱によって細胞接着が阻害されると考え、AG コーティング後に HBC を十分洗浄して、細胞培養に用いた。AG の溶出によるものと考えられる細胞接着の阻害は減少したが、AG による細胞接着の向上は、確認できず、AG のより強固な吸着が必要であると考えられた。HBC と HRC の比較: HBC は HRC に比べて細胞の接着が良かった。しかし、HBC では平面に広がって細胞が接着していた。これらの違いは、セルロースの結晶構造によるものと考えられるが、肝臓の機能を発現させるスフェロイドの形成という点では、HRC がより優れた細胞培養基質であることが示された。

1) J. Nemoto, et. al. *Bioresour. Technol.* 96, 1955–1958 (2005).