

北海道大学工学部 ○山田浩司、西村生哉、下岡聡行、  
見藤 歩、村林 俊、勇田敏夫

### 要旨

生体材料を開発する上で、重要な問題となるのが生体組織と材料表面の反応である。この2つの間の相互関係を明らかにするため材料表面上の細胞挙動を観察した。

この結果、なめらかな表面に対し形状変化させた表面上において細胞接着形態に著しい違いが観察された。

### 1. 緒言

生体内で人工材料を使用する場合、材料表面と生体組織間の反応が問題となる。特に材料表面上での細胞の接着、移動現象を解明することは生体材料を設計する上で重要な課題となる。

この問題に対するアプローチは多くの研究者によって古くから行われている。これらによると、細胞は材料表面の性状によりそのふるまいを変えようという報告がなされている。古くから指摘されていることに細胞の形状追従効果 (CONTACT GUIDANCE) がある<sup>1,2)</sup>。これは細胞が材料表面形状に沿った接着形態をとることを示したものである。また材料表面の親水、疎水性、荷電状態が細胞接着に与える影響に関する報告もなされている<sup>3,4)</sup>。しかし、これらの研究では、材料表面と細胞接着の関係を解明するに至っていない。

そこで、本研究では材料表面の性状変化が細胞接着に与える影響について観察し、その相互関係の検討を行っている。

### 2. 実験方法

#### 2.1 試料の作製

試料には、表面の加工性を考慮して、スライドガラス (12mm×12mm) 上にアルミニウム薄膜を形成したものを使用した。薄膜はスパッタリング法により作製し、膜厚は蒸着時間を調節することにより5μm、10μmに制御した。

この試料の表面を図1に示すフォトケミカルエッチング法により目的の形状に加工した。この方法は紫外線の照射によりアルミニウム上に塗布したフォトレジスト膜 (AZ1350) が現像液に溶解し、選択的にエッチングする方法である<sup>5)</sup>。露光用原版は、幅40μmのアルミニウムが等間隔でストライプ状に並び、近接部が互いに接続しないように作製した。エッチング液には50%りん酸水溶液を使用した。

さらに、パターン部分と溝部分の材質を均一にするため、試料上に一様にアルミナ薄膜を蒸着した。

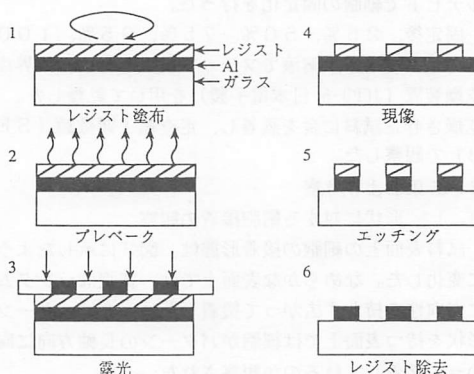


図1 フォトケミカルエッチング法

#### 2.2 試料表面形状

パターン部分の形状は、レジスト膜の接着力、エッチング条件 (時間、エッチング液) により変化する<sup>5)</sup>。

本研究では、この条件を変えることにより図2に示す四角形と三角形の2種類の形状のパターンを用意した。作製した試料のパターン幅はサイドエッチ現象のため20~30μmに減少した。

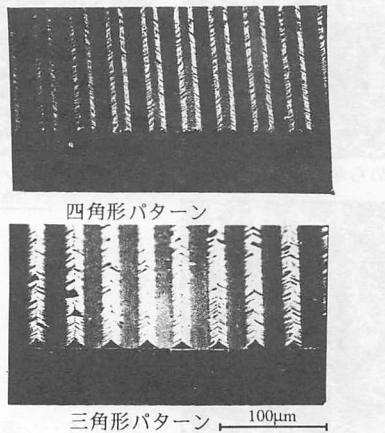


図2 試料表面パターン形状

### 2.3 細胞培養

実験には、マウス由来細胞株L929とL細胞を使用した。これを $1 \times 10^4$  cell/mlに調節し、試料を静置したカルチャーデッシュに4ml分注した。そして、これを37℃、5% CO<sub>2</sub>で2~5日間インキュベートした。培地は10%牛胎児血清(FBS)を含むイーグルの最少必須培地(MEM)を用いた。

### 2.4 細胞形態の観察

培養実験後、リン酸緩衝液(pH7.4 0.1M)により洗浄し、同緩衝液により調製した1%、4%グルタルアルデヒドで細胞の固定化を行った。

固定後、25%、50%、75%、95%、100%のエタノール水溶液でステップ脱水を行い、臨界点乾燥装置(JCPD-5,日本電子製)を用いて乾燥した。乾燥させた試料に金を蒸着し、走査電子顕微鏡(SEM)で観察した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 形状に対する細胞接着の観察

試料表面上の細胞の接着形態は、図3に示したように変化した。なめらかな表面上では、細胞はランダムに方向性を持たず広がって接着した。一方、パターン形状を持つ表面上では細胞がパターンの長軸方向に向かって接着しているのが観察された。

また、三角形の形状パターンをもつ試料表面では細胞が三角形の頂点に沿って並んで接着しているのが観察された。このことより表面の形状が細胞の接着に影響を与えることが示唆される。

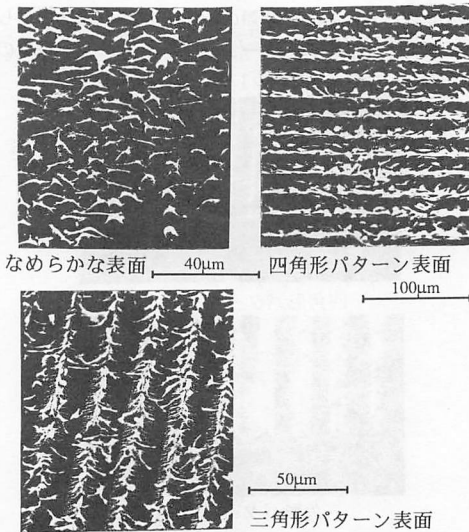


図3 表面形状による細胞接着の変化

### 3.2 細胞接着の経時変化

図4は溝深さ10µm、四角形のパターン形状を持つ表面上での細胞接着の経時変化を示したものである。培養3日目、細胞はパターン上にはあまり観察されずパターン部分の側壁に接着している。4日目、細胞は側壁からパターンのエッジへと移動している。5日目には、パターンのエッジに沿って伸長している細胞が観察される。すなわち試料表面の溝部分に接着した細胞は時間の経過とともに移動し、パターンの側壁にぶつかるとそれを認識し登り始める。そしてパターンを乗り越えずにエッジに沿って伸長する。

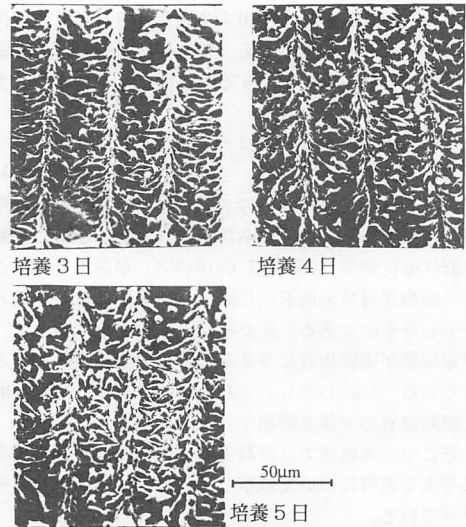


図4 細胞接着の経時変化

## 4. 結論

試料表面上の形状を変化させた実験の結果、以下に示す結論を得た。

- (1) 試料表面にストライプ状のパターンを形成すると、細胞はパターン部分の長軸方向を向いて接着する傾向があることが観察された。
- (2) 細胞の移動の経時変化を観察すると、細胞はパターンの側壁を登りエッジに沿って伸長する傾向がある。これは細胞の形状追従効果と一致するものである。

### 参考文献

- 1) Wess, P., Growth (suppl.) 5(1941)163
- 2) D.M. BRUNETTE, Exp Cell Res 164(1986)11-26
- 3) 松田武久, 生体材料 Vol.10 (1992)18-35
- 4) 木村守隆, 神奈川歯学 76-89, 1987
- 5) 橋本貴夫, 図説フォトファブリケーション 総合電子出版社