(1999年11月8日受付・2000年1月6日受理)

細胞培養床アパタイトシートの特 性およびシートを使用したCHO-K1細胞の静置培養

福岡県工業技術センター生物食品研究所 川勝博伸・井手誠二・奥田泰真

Characterization of Cell Culture Bed Apatite Sheet and CHO-K1 Cell Static Culture on Apatite Sheet Bed

Hironobu Kawakatsu, Seiji Ide and Yasumasa Okuda

Biotechnology and Food Research Institute, Fukuoka Industrial
Technology Center, 1465-5, Kurume, Fukuoka., 839-0861, Japan

Abstract : New type cell culture bed apatite sheet was made from Hydroxyapatite-pulp composite fiber (HAPC) and polyethylene fiber by the method as wide as possible to open surface area using paper making technique. It has become apparent that apatite sheet has good structure for cell culture bed. The sheet has many 10-200 μ m diameter pores which were formed by ribbon tape shape HAPC. And pore had suitable apatite surface on which mammalian cell grow. These pores linked from top side of sheet to bottom side, and its surface area was 0.32m²/g. CHO-K1 cell were statically cultured in high density on apatite sheet bed which was set in 60mm plastic dish with 7ml Ham F-12 medium including 10%FBS. Cell culture bed apatite sheet is expected to be used extensively for cell culture procedure by researcher working in biological industry

(Received 8 November, 1999 ; Accepted 6 January, 2000)

1. 緒 言

筆者らは、パルプ表面でのヒドロキシアパタイトCa₁₀(PO₄)₆(OH)₂(以下、アパタイトあるいはHAp)の結晶合成反応を利用してアパタイト・パルプ複合体繊維(以下、HAPC)を作ること成功した[1]。HAPCはパルプが芯でアパタイトが鞘の構造となっているため、形態はパルプ繊維状をしている。その結果、HAPCはパルプと同じように取り扱い、抄造法により容易にシート化が可能である[2]。HAPCを原料にしたアパタイトシートはアパタイトの特性であるイオン吸着性が付与されているため、生体物質の吸着特性がある。その特徴を活かしてシートをタンパク質・核酸吸着シート[2]、あるいは核酸分離画用シート[3]などへ用途展開を図っていく研究を行った。

一方、アパタイトの応用研究という面では、それが持っている生体親和特性を活かしてアパタイトを動物細胞培養用の細胞付着材料として利用する研究が行われている。そのなかでは、アパタイトをセラミックス板、あるいはビーズ状担体という形態で使用方法が報告されている[4,5]。細胞付着材料の形態としては、その他に繊維を原料としたシート状材料があり、ポリエステル不織布などを培養床として利用する研究が行われている。シート材料は付着表面積の広さ、取り扱いの容易さ、成形加工のし易さなどビーズ状担体にはない利点が示され、ポリエステル不織布を培養床として使用した動物細胞大量培養装置なども考案されている[6,7]。しかし、不織布材料にも原料繊維の表面が細胞への親和性に乏しいなどの問題点が指摘されている。実際には細胞への親和性を付与するため繊維表面にコラーゲンタンパク質皮膜など

が施されて使用されているが、不織布培養床は普及してはいない。現在においても、細胞培養用材料に関する研究の中で細胞付着・増殖性に優れたシート状培養床の開発が続けられている。しかしながらこれまで繊維状のアパタイトを成形加工したシート状培養床に関する開発研究の例はない。それは、アパタイト繊維を作成することが困難であったため、実用的なアパタイトシートが製造されなかったことが原因であると考えられる。

筆者らが開発したアパタイトシートはHAPCという繊維形態をしたアパタイト材料を原料として製作されており、動物細胞に対して親和性があると推測される非晶質アパタイト表面を有している。このような点からみて、アパタイトシートはこれまで細胞培養床として検討されてきた化学繊維製の不織布と同様の物理特性を持っており、さらにそれに加えて不織布に不足している良好な細胞付着特性を発揮すると思われるため、新しい細胞培養床として使用できると期待される。

そこで、本研究では、HAPCを原料にして新たに細胞培養床用のアパタイトシートを開発した。シート表面の形状、あるいは細胞が付着する場であるシート細孔の状態などを分析した結果、シートが細胞培養床として優れた構造となっていることを明らかにした。さらに、試作したアパタイトシートを培養床としてCHO-K1細胞をプラスチック培養皿で培養した結果、細胞がシート表面で良好に付着・増殖したことを報告する。

2. 実 験

2.1 細胞培養床アパタイトシートの作成

既報[1,2]に基づきHAPC合成装置を用いて、未叩解の市販針葉樹晒クラフトパルプ(N-BKP)15gを懸濁させた0.06mol/L硝酸カルシウム溶液1000mlに、0.12mol/Lリン酸水素2アンモニウム溶液300mlを滴下する方法でHAPCを合成した。反応条件は反応温度50℃、反応pH8で5mol/L水酸化ナトリウム溶液を用いてpHの制御を行いながらHAPC(試料名をHAPC(NP-0)と略)液を作成した。850℃で灰化した後の灰分測定によりHAPC(NP-0)にはアパタイトが20WT%付着していることが確認された。

4等分したHAPC(NP-0)液を原料にして、従来法[2]に基づいて角型シートマシンで抄造法によりシート化した後、円筒型電気ヒーター式の回転乾燥機を用いて120℃で乾燥しアパタイトシート(25×25cm²)を作成した。この操作によりHAPC(NP-0)液中の未付着アパタイト粒子のほとんどがシートマシンろ液として除去される。しかし、シートにはわずかに複合体化されなかったアパタイト粒子が残存しているため、それを取り除くためにシートを攪拌機で再度離解し、それを細胞培養床アパタイトシー

トのためのHAPC原料(HAPC(NP)と略)液とした。原料HAPC(NP)80WT%とポリオレフィン系の繊維状バインダーEKC(チッソポリプロ繊維株)20WT%配合し、角型シートマシンで抄紙した後、自然対流式の乾燥機内で乾燥させた。その際、乾燥温度はバインダーの融点(105~130℃)より高い135℃とした。ヒーター式回転乾燥機を使用しないためプレス乾燥されないの、繊維の密着が少なく空隙が広いシート材料が作成される。

2.2 細胞培養床アパタイトシートの特性の分析

細胞培養床アパタイトシートはイオンコーター(E-1030, 日立製作所株)によるPt-Pd蒸着後、走査型電子顕微鏡(S-4500, 日立製作所株)を用いて表面観察した。また、水銀圧入方式のポロシメーター(ポアサイザ9310, 島津製作所)によりシート中に存在する直径が0.1~250μm範囲の細孔の容積、表面積を測定した。さらに、JISに準じてシートの引張強さ(JIS P8113)、透気度(JIS P8117)を測定した。

2.3 CHO-K1細胞の細胞培養床アパタイトシート上での培養

培養実験には、CHO-K1細胞(チャイニーズハムスター卵巣細胞)(RCB0285, 理研ジーンバンク・細胞開発銀行)を用いた。初期培養では、10%ウシ胎児血清(FBS)(GIBCO BRL)を含むHamF-12(GIBCO BRL)培地を用い、炭酸ガス濃度5%のインキュベーター中37℃で培養した。細胞の継代の際には細胞分散剤として0.25%トリプシン溶液(1mMのEDTAを含む)(GIBCO BRL)を用いた。細胞培養床アパタイトシートは、蒸留水で二回洗浄し、蒸留水中で121℃、20分間オートクレーブ滅菌後、培養培地で二回洗浄した。

60mmプラスチック培養皿に数回継代し、コンフルエントになった細胞をトリプシン処理により分散させた。60mmプラスチック培養皿中におかれた面積25×25mm²、厚さ0.41mmのアパタイトシート上に細胞2.8×10⁵個接種し、10%FBSを含むHamF-12培地7mlを加えた。炭酸ガスインキュベーター中で培養し、2日毎に培地の交換を行い9日間培養した。培地の交換は細胞が付着したシートを新鮮な培地7mlが入った新しい培養皿にピンセットで摘んで移し替えることにより行った。

培養終了後、細胞が付着したシートをPBS(GIBCO BRL)で洗浄し、エタノール上昇系列(70, 80, 90, 95, 100%)で脱水し、最後にt-ブチルアルコールで置換した。次に、フリーズドドライヤー(ES-2030, 日立製作所株)で凍結乾燥後、イオンコーター(E-1030)によるPt-Pd蒸着を行い、走査型電子顕微鏡(S-4500)を用いてシート表面の細胞を観察した。

3. 結果および考察

3.1 細胞培養床アパタイトシートの特性

シート作成操作により大きさ $25 \times 25 \text{ cm}^2$, 厚さ 0.41 mm , 坪量 85 g/m^2 の細胞培養床アパタイトシートが得られた。比較として既報の作成方法[2]に基づいてHAPC(NP-0)をシート化したアパタイトシート(シートNP-0と略), および叩解度c.s.f.420mlに調整したNBKPを原料にしたHAPCを同様にシート化したアパタイトシート(シートNP-1と略)を作成した。これらのシートには非晶質のアパタイトが付着していることがX線回折スペクトルにより確認されている[1,2]。図1に3種類のシートの細孔容積分布を示した。細孔容積分布から求められた細胞培養床アパタイトシートの細孔容積量, 表面積, 裂断長および透気度をまとめた結果を表1に示した。

Fig. 1 Pore volume of cell culture bed HAp sheet and conventional HAp sheet.

Table 1 Characterization of Cell Culture Bed HAp Sheet and Conventional HAp Sheets

Sample code	Intrusion volume cc/g	Surface area ^{a)} m ² /g	Breaking length km	Air permeability s/100ml
Cell Culture Bed Sheet	2.86	0.32	1.11	0.18
Sheet NP-0	1.71	0.18	0.28	0.50
Sheet NP-1	0.78	0.035	2.61	26.8

^{a)}pore diameter : 10~200μm

細胞培養床アパタイトシートおよびシートNP-0の細孔容積はそれぞれ2.86および1.71cc/g, であり, 前者の容積は後者の1.7倍程度大きい。細孔直径の大きさの分布は動物細胞が付着増殖するのに適しているとされている10~200μmの領域に集中しており, 細胞培養床アパタイトシ

ートは細胞付着材料として優れた特性を有している。細孔容積の増大に伴い, 表面積も広くなり, シートNP-0に比較して, $0.32 \text{ m}^2/\text{g}$ と1.8倍の値を示した。従来法で作成したシートNP-0およびシートNP-1の細孔容積, 表面積の差は原料パルプの叩解の程度に依存し, 叩解が進んだパルプが原料となったHAPCをシート化したシートNP-0が細孔容積は小さい。アパタイトシートもパルプ紙と同様にパルプの叩解の程度によって, シートの細孔容積, 表面積が決定されていることがわかる。同じHAPCを原料としていながら細胞培養床アパタイトシートはシートNP-0より細孔容積が大きい。これは原料繊維の叩解度だけではなく乾燥条件もシートの細孔容積量を増減させることを示している。プレス無しの乾燥によりシートの細孔容積を大きくできることになり, この方法を発展させると湿式のシート形成よりも乾式のシート形成を行えばさらに細孔容積の大きい細胞培養床アパタイトシートの開発が期待される。しかし, どの程度の大きさの穴が必要であるかは細胞の種類によって違ってくると推測される。

アパタイトシートの培養床としての特性は細孔容積だけで判断することはできない。シートの強度および透気度も実際に使用する時点では重要である。これらの特性も原料パルプの叩解度に依存しており, 叩解度の高いパルプを原料にしたシートNP-1の引張強さは大きい。シートNP-0は弱く実用的な強さとは言えない。一方, 透気度はシートNP-0が小さく通気性が良いことを示している。未叩解のパルプを使用することにより細胞の付着する細孔容積を大きくし, 同時に培地溶液の通液性に関与する透気度を小さくすることができるが, その結果として繊維間結合が減少しシート強度は低下することになる。培養床として使用されるシートとしては大きな細孔容積を持っていることが必要であるが, それと同時に培養液中での使用が主になるためシートはろ紙程度の強度でなければならない。この相反する特性を両立させるためにバインダー繊維の配合とプレス無しの乾燥方法が重要となってくる。プレス無しの乾燥方法により細孔容積が大きく通気性が良好な特性を持ち, バインダーの強度増強効果により十分な強度を持った培養床シートを作成可能であることが明かとなった。

細胞培養床アパタイトシートの電子顕微鏡観察像を図2に示した。観察像から細胞培養床アパタイトシートには幅約200μm以下の隙間が多くあることが確認される。ポロシメーターの分析では細孔として計測されているが, 繊維間の隙間であることが観察される。このシートの隙間の特徴として, シートが抄造法によりHAPC単繊維を積層して造られているため, 隙間が一方の面(表)から他

Fig. 2 SEM images of cell culture bed HAp sheet.

Fig. 3 SEM images of CH-K1 cell cultured on cell culture bed HAp sheet.

の面(裏)に網の目状に繋がった構造となっていることが挙げられる。細胞培養床としての性能を考えると、細胞がシート内部まで付着・増殖し高密度で培養されることが重要である。そのためには、栄養源および酸素供給のため培養液が培養床内部へ効率良く流動されなければならない。良い流動のためには培養床に内部まで連続して繋がっているある程度の大きさの穴が形成されている必要がある。細胞培養床アパタイトシートはそのような細孔構造を有した材料であると言える。

3.2 細胞培養床アパタイトシートでのCHO-K1細胞の増殖

図3に細胞培養床アパタイトシート表面で増殖したCHO-K1細胞の電子顕微鏡写真を示した。シート表層の繊維表面だけでなく、少し下層の繊維表面にも増殖している。しかし、シート中心部までは細胞は増殖していないことが確認された。これは今回の培養がプラスチック培養皿中での静置培養であるため、培地栄養成分や酸素の供給がシート表層面のHAPC表面に限られているためと考えられる。1枚のシート当たり 9.1×10^6 個のCHO-K1細胞が生育していた[8]。この細胞数はシート単位面積当りに換算すると 1.5×10^6 個/cm²の細胞密度となり、細胞が

通常の方法で培養皿中で培養された時に到達する細胞密度の約10倍になっている。

これまで細胞付着担体として研究されているアパタイトは焼結された結晶性のものである。これらは、円盤状、あるいはビーズ状に成形された後焼結されて細胞培養実験に供試され、良い結果が得られている[4,5]。一方、今回細胞培養床アパタイトシートのアパタイトは非晶質であり、非晶質アパタイト表面での細胞の付着性に関する研究は行われていなかった。しかし、今回の培養実験によりCHO-K1細胞に対する親和性が優れていることが明らかとなり、非晶質アパタイトも細胞培養用の細胞付着材料として利用可能であると考えられる。

また、細胞が付着する場であるHAPCに着目すると、その形態は幅20~80μmのリボン形状をしており、細胞はHAPCの表面に横に並んで広がったように増殖している。従来検討されてきたポリエステル繊維不織布の細胞培養床では、繊維の直径が10μmの円柱状をしている[6,7]。この大きさの繊維は細胞の足場としては少し細いと推測され、Hela細胞は複数の繊維にまたがって付着していることが観察されている[6]。一方、HAPCはそれらと比較

して扁平で幅が広いため10 μ m程度の大きさのCHO-K1細胞が付着・増殖していくために良い足場(床)となっている。

今回の実験での細胞培養床アパタイトシートの使用方が培養皿中での静置培養であったため、細胞はシート表層部でしか増殖しなかった。細胞がシートの中心付近でも増殖できるようにするためには、連続培養用バイオリアクター装置での灌流培養のようにポンプを使って強制的に培地をシート内部へ供給してやるが必要になってくる。そのような培養を行えばシート中心部で細胞が増殖可能になり、細胞培養床アパタイトシートを用いた高密度での細胞培養が可能になると期待できる。今後、細胞培養床アパタイトシートを利用した動物細胞用培養装置の開発を目指していきたい。

本研究の一部は、平成11年度繊維学会年次大会研究発表会(平成11年5月、千葉)で発表した。

文 献

1. H. Kawakatsu, *Kinoushi Kenkyukaishi*, **32**, 28(1993).
2. H. Kawakatsu, Y. Okuda, and S. Sukimoto, *Sen'i Gakkaishi*, 投稿中(受付番号: 99060).
3. H. Kawakatsu, S. Ide, *Sen'i Gakkai Prepr.*, 1998, P-5.
4. T. Suzuki, M. Toriyama, Y. Kawamoto, Y. Yokogawa and S. Kawamura, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 164(1990).
5. 水谷悟, 「バイオリアクターの世界」(小林猛ほか編), ハリオ研究所, p.259(1992).
6. S. Mitsuda, Y. Matsuda, Y. Itagaki, A. Suzuki, E. Kumazawa, K. Higashio, and G. Kawanishi, *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 289(1990).
7. J. Robert, J. Cote, and J. Archambault, *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 697(1992).
8. H. Kawakatsu, *Sen'i Gakkai Symp. Prepr.*, 1999, S-120.