

OS2-4

流体力学的負荷に対する細胞応答評価ツールの基礎検討

Basic study on the evaluation tools of cellular response to hydrodynamic load

○ 松永裕樹 (電機大院・理工) 幡多徳彦 (電機大・フロンティア共研セ)

野中一洋 (電機大・理工) 福井康裕 (電機大・理工) 舟久保昭夫 (電機大・理工)

Hiroki MATSUNAGA, Graduate School of Science and Engineering, Tokyo Denki University

Norihiro HATA, Frontier Research and Development Center, Tokyo Denki University

Kazuhiro NONAKA, Science and Technology, Tokyo Denki University

Yasuhiro FUKUI, Science and Technology, Tokyo Denki University

Akio FUNAKUBO, Science and Technology, Tokyo Denki University

Abstract: The parallel plate chamber with acrylic plate was designed and developed to simulate the mechanical environment in vivo. Fatal rat aortic smooth muscle cells (A-10) culture were cultured and observed at varied flow rate of medium in the developed chamber. Furthermore, the angled fibrous scaffold was fabricated on culture surface with electrospinning. The influence of fiber orientation was examined with the developed chamber in cell culture. The cellular behavior was evaluated quantitatively with image analyses. It was clear that the cellular behavior was varied with the increase of flow rate.

Key Words: Perfusion culture, Scaffold, Ascular prostheses

1. 緒言

近年、埋植した人工肺といった人工臓器に生体親和性が高い Scaffold を表面にコーティングして拒絶反応を抑制する取り組みが行われている。生体内における Scaffold 上を増殖する細胞の定量的評価がなされていない。そこで本研究はエレクトロスピニング法で作製した繊維性 Scaffold を用いて、繊維の配向性と流れ負荷によって細胞挙動に与える影響の検討・指標策定及び、非侵襲的に人工肺の表面をモデリング行うために人工血管を模擬した最小ユニットのベースを設計し、埋植した人工肺上の細胞の評価を行うツールの開発を目的とした。

2. 実験

2-1 平行平板チャンバーの作製

人工血管内表面を再現するためにシリコンを用いて Fig.1 のような平行平板チャンバーを作製した。培養面は細胞培養用にガスプラズマ処理された 60mm シャーレ (BD 社製) を用いた。

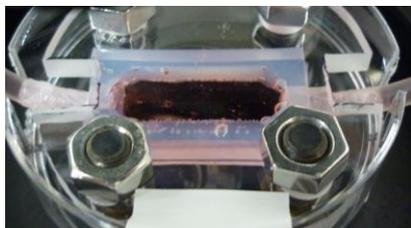


Fig.1 Parallel-plate chamber

2-2 実験方法

ギアポンプを用いた灌流培養法で実験を行った。本研究ではラット胎児胸部大動脈平滑筋(以下 A10)を用いて培地 D-MEM(High glucose) +10%FBS の静置環境下における細胞の挙動と流動環境下における細胞の挙動の検討を行った。実験条件は Table 1 で、72 時間 10 分間隔のタイムラプス撮影を行った。

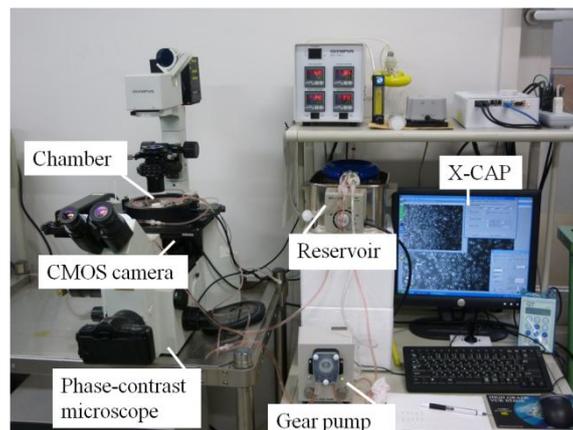


Fig.2 Experimental apparatus

Table 1 Experimental conditions

Medium amount of circuitry [mL]	150
Cell inoculation density [cells/cm ²]	0.5×10 ⁴
Medium temperature [°C]	37
CO ₂ concentration [%]	5
Medium pH[-]	7.6
Flow rate[mL/min]	2, 4, 16

また、エレクトロスピニング法を用いて作製した繊維性 Scaffold 上の細胞の静置環境下と流動環境下における挙動の検討を行った。72 時間 10 分間隔のタイムラプス撮影で培養条件は Table1 の通りに行った。Scaffold の作製条件は Table2 に示す。

Table 2 Conditions

Solute:SPU [wt/v%]	13
Solvent:THF:DMF	7:3
Discharge rate [mm/min]	0.15
Distance between electrodes [mm]	200
Cathode size [mm ²]	100×100
Room temperature [°C]	25
Humidity[%]	40
Deposition time[min]	5

3. 結果

静置環境下と各流量流動環境下での細胞濃度の変化を Fig.3、Scaffold 上における静置環境下と各流量流動環境下での細胞濃度の変化を Fig.4 に示す。灌流培養と静置環境下における培養時の細胞の移動速度、Scaffold 上における静置環境下と各流量流動環境下での細胞の移動速度を Fig.5 に示す。実験結果より Scaffold の有無に関わらず静置環境下での培養と比較すると流動環境下では細胞増殖はほとんど確認されなかったが細胞の伸展は観察された。

細胞の移動速度は Scaffold がある場合の方が速いことが確認された。

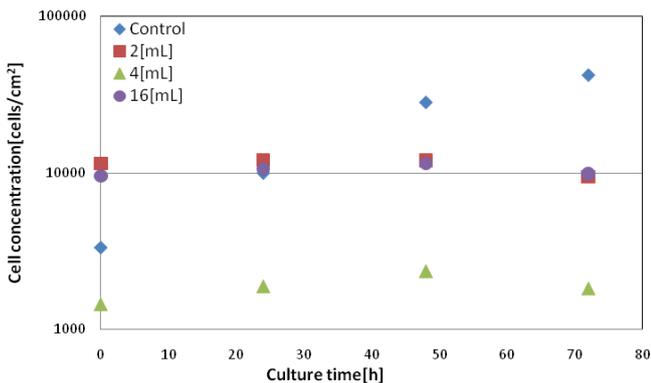


Fig.3 Changes in cell concentration without scaffold

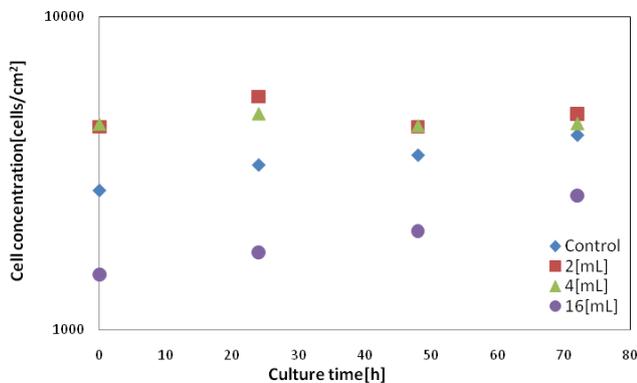


Fig.4 Changes in cell concentration with scaffold

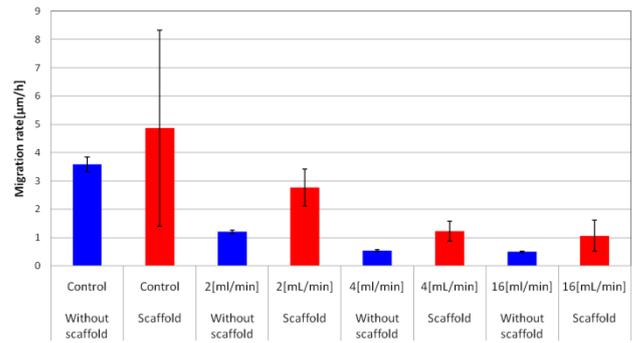


Fig.5 The average of migration rate in each culture

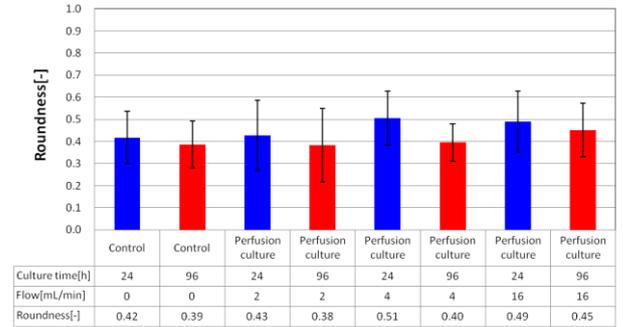


Fig.6 The average of roundness without scaffold

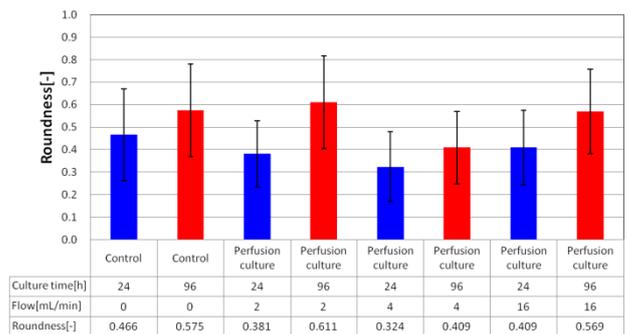


Fig.7 The average of roundness with scaffold

4. 考察

Fig.3,4 より Scaffold の有無に関わらず、各流量環境下における細胞の増殖が確認できなかった。これはチャンバー内の培地の流れによって細胞の外縁に剪断応力が加わり細胞の増加量が伸びなかったと考えられる。

Fig.5 より流速の増加に伴い平均移動速度が減少することが確認され、Scaffold が存在することにより平均移動速度が増加することが示された。また、Fig.6,7 より Scaffold 上の細胞は円形になりやすいことが確認された。これらは Scaffold に付着している細胞が培地の流れ負荷の影響を受けやすかったからだと考えられる。

5. 結果

灌流培養法を用いて流動環境下で細胞を培養した結果、細胞に負荷を与えると細胞移動が減少、増殖しないことが示された。また、足場の異なる環境における細胞挙動のパラメータを策定できた。

6. 参考文献

(1)K.Sumida et al J.Toxic, Science, 2007