

イオンビーム照射によるフッ素系高分子材料表面の形状自己組織化制御

○喜多村 茜^{1,2}、小林 知洋²、鈴木 晶大¹、寺井 隆幸¹

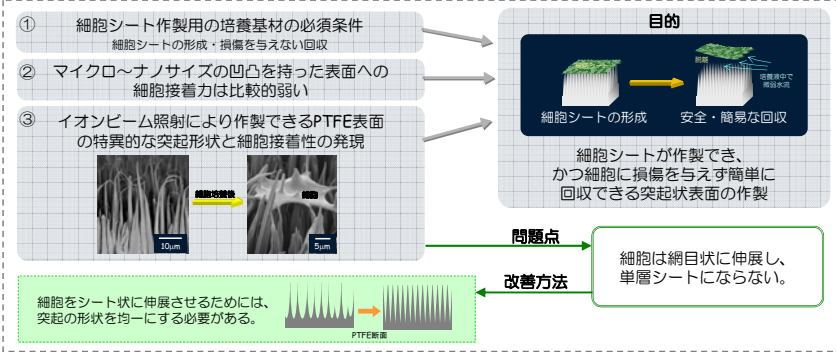
¹ 東京大学大学院工学系研究科 原子力国際専攻、² 理化学研究所

E-mail: kitamura@nuclear.jp

1. 研究背景

欠損または機能不全に陥った組織・臓器に対する新たな治療法として、治療の対象となる臓器を生体外で構築したのち再び体内に移植する再生医療の発展が望まれている。組織の再構築のためのアプローチとして、シート状の細胞集合体を1ユニットとして構築させる手法は臨床的観点から有力視されている。本研究では、**細胞シートを作製するための細胞培養基材の作製**を目的としている。

- ① 細胞シート工場で用いる細胞培養基材の必須条件は、(1)細胞シートを作製できること、(2)作製した細胞シートを無菌に回収できることである。現在一般的に用いられているものは、(2)の要求を基板表面にグラフトした温度応答性ポリマーによって構築させる手法は臨床的観点から有力視されている。本研究では、**細胞シートを作製するための細胞培養基材の作製**を目的としている。
- ② ①に挙げた基材を含め一般的な細胞培養基材の表面は平面状である。しかし近年、フォトリソグラフィやナノインプリント法などによって作製したマイクロ～ナノサイズの凹凸を持つ表面上でも細胞培養が可能であることが報告され、その細胞接着力は非常に弱いことがわかってきた。
- ③ 我々はこれまでに、代表的なフッ素系高分子であるポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 表面にイオンビームを照射すると、エッチングおよび、帯電やポリマー内部の原子間・分子間力の変化で自己組織化的に高密度かつ高アスペクト比を持った突起状の凹凸が形成されることを明らかにしてきた。さらにこの突起状表面上で細胞を培養すると、膜状に伸展することも明らかになっている。



2. 実験方法

試料作製

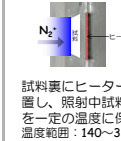
試料
PTFEの他に、試料の温度上昇の影響をより反映させるためPTFEに比べて低温で軟化するpolytetrafluoroethylene-co-hexafluoropropylene (FEP)を用いた。

	PTFE	FEP
分子構造	$\left[\begin{array}{c} F & F \\ & \\ C-C \\ & \\ F & F \end{array} \right]_n$	$\left[\begin{array}{c} F & F & F & F \\ & & & \\ C-C & -C-C & -C-C & -C-C \\ & & & \\ F & F & F & F \end{array} \right]_m$
融点	327°C	275°C
細胞接着性	無	無
光透過性	無(乳白色)	良

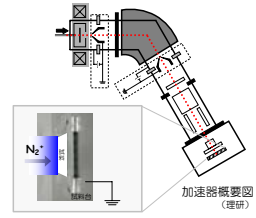
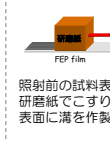
照射条件

試料	PTFEフィルム (厚さ50μm)
	FEPフィルム (厚さ25μm)
イオン種	N ₂ ⁺
加速エネルギー	80 keV
電流密度	0.3 μA/cm ²
照射量	1×10 ¹⁵ ~ 1×10 ¹⁷ ions/cm ²

試料加熱方法



ラビング方法

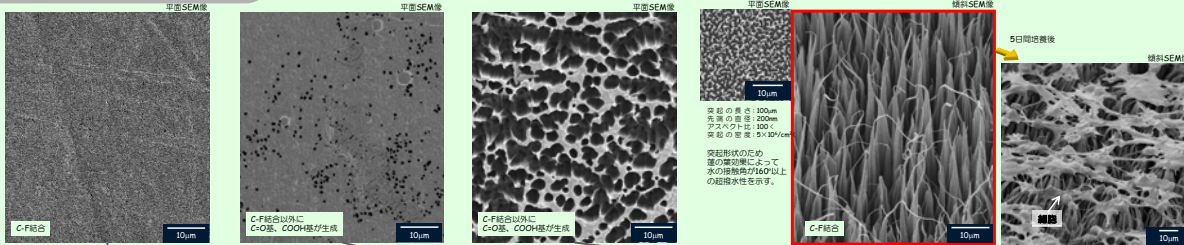


表面分析

形状観察	走査型電子顕微鏡 (SEM)
化学結合分析	X線光電子分光法 (XPS) 全反射フーリエ変換赤外分光法 (ATR/FT-IR)
可視光透過率	マルチチャンネル分光計
濡れ性	水の接触角測定
細胞接着性	マウス由来繊維芽細胞 (L929) を3日間および5日間培養後、位相差光学顕微鏡で観察。また細胞の固定・脱水処理後にSEM観察。

3. 結果と考察

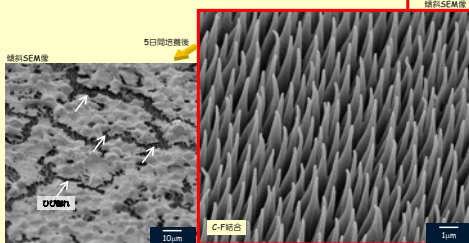
加熱せずに照射した PTFE 表面



- ▶ 表面形状は照射量の増加とともに孔孔状から突起状へと変化する。
- ▶ 照射量が1×10¹⁷ ions/cm²で形成される突起は先端がウィスカー状になっており、形状均一性が低い。
- ▶ この表面で細胞は網目状に伸展する。
- ▶ PTFE試料は乳白色のため、表面に接着した細胞の観察は、乾燥・脱水処理を経たSEMによるものとなり、生存した状態では観察できない。

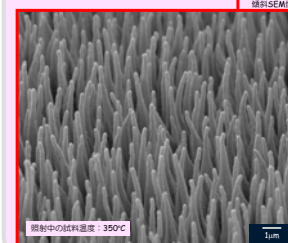
加熱せずに照射した FEP 表面

- ▶ 照射量1×10¹⁵ ions/cm²で表面は突起形状となった。
- ▶ PTFEを加熱しながら照射するよりも低照射量である。
- ▶ 突起はサイズが小さくなり、形状均一性が向上した。
- ▶ FEPはPTFEよりも融点の低いので、ヒーターで加熱することなく試料温度は形状改善効果を得られる直にまで到達した。
- ▶ 細胞培養後のSEM像にはひび割れが見られるが、形状から、SEM観察用に行った乾燥・脱水処理の過程で生じたものと考えられる。
- ▶ 培養中は単層のシート状になっている。

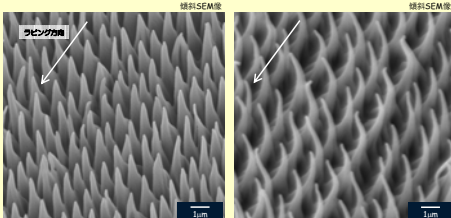


照射中に加熱した PTFE 表面

- ▶ 照射中の試料温度を一定に保った場合、240°C～350°Cの範囲では温度が高いほど突起は長くなった。
- ▶ 試料温度の上昇は形状変化を促進させる。
- ▶ 照射中の試料温度を350°Cに保った場合、照射量が3×10¹⁶ ions/cm²ですでに表面は突起形状となった。
- ▶ 加熱しない場合と比較すると突起はサイズが小さくなり、形状均一性が向上した。
- ▶ 比較的弱い領域や突起先端部分は蒸発し易くなり、かつPTFE分子の流動性が高まったことから突起表面が均されたためと考えられる。

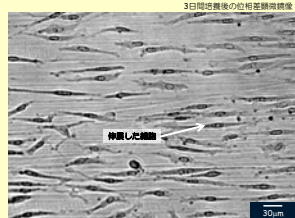


ラビング処理後に照射したFEP表面



- ▶ ラビング方向に沿って等間隔に突起を配列させることができた。
- ▶ ラビングによって形成される溝が優先的にエッチングされ、残された峰の部分に突起が生成したと考えられる。
- ▶ この峰の部分に形成された突起の間隔はほぼ一様である。これは突起を形成する過程で、個々の突起が帯電し、突起間に静電的な斥力が生じて等間隔になったと考えられる。

位相差顕微鏡による生きた細胞のその場観察



- ▶ FEPは照射後でも高い光透過性を持つため、位相差顕微鏡を用いた生細胞の観察ができる。これは光透過性のないPTFE試料では実現できないことである。
- ▶ ラビング方向に沿って細胞を配列させることが可能であることがわかった。

4. まとめ

- フッ素系高分子材料表面へのイオンビーム照射によって細胞培養が可能なる突起状表面を作製することができる。
- PTFEよりも融点の低いFEPを用いることで下記のような利点が得られる。
 - ・ 突起形成に必要な照射量を低減することができる。
 - ・ 突起形状の均一性を大幅に改善できる。
 - ・ 照射前のラビング処理によって突起を配列させることができる。
- ・ FEPはPTFEにはない高い光透過性を持つため、光学顕微鏡を用いることで、表面に伸展した細胞を乾燥させることなく生存した状態で観察できる。
- ・ 作製したこれらの突起は、「細胞の移動に合わせて先端が数百nmほど曲がることで伸展を助長させる」といった細胞培養基材としては特異な特徴を持つ。