

三次元スキヤフォールドを用いた細胞培養系の評価方法の検討

迫田秀行[#]・中岡竜介・松岡厚子・土屋利江

Study of evaluation methods for cell culture system using three-dimensional scaffolds

Hideyuki Sakoda[#], Ryusuke Nakaoka, Atsuko Matsuoka and Toshie Tsuchiya

In tissue engineering and related studies, *in vitro* evaluations are often carried out by a three-dimensional cell culture, where cells are inoculated in three-dimensional scaffolds. Cell number is one of the most fundamental parameters in cell cultures and especially important in three-dimensional cell cultures because cell behavior is sometimes dependent on the cell density. However, there are many studies where cell number is not specified, probably due to the difficulty of evaluating cell number in the three-dimensional cell culture.

In this study, we examined if existing methods to evaluate cell number established for conventional two-dimensional cell cultures could be applied to the three-dimensional cell cultures using collagen composite scaffolds and human articular chondrocytes as an example of the three-dimensional cell culture. The cells were inoculated on the conventional cell culture plate or the scaffolds and the cell number was estimated by different methods and the results were compared with each other. Firstly, DNA quantification method was shown to be able to estimate cell numbers in either two-dimensional or three-dimensional culture. Secondary, the results of non-destructive cell number estimation method using alamarBlue reagent were found to be consistent with those of DNA quantification method in either two-dimensional or three-dimensional culture. However, the results of the other non-destructive cell number estimation method using TetraColor ONE reagent were not consistent with those of other methods in the three-dimensional culture.

It was concluded that when applying existing evaluating methods established for the two-dimensional cell cultures to a three-dimensional cell culture, it is important to validate them for the three-dimensional cell culture.

Keywords: three-dimensional cell culture, scaffold, tissue engineering, cell number

1. 緒言

再生医療やそれに関する研究では、細胞を医用材料で立体的に構築された三次元スキヤフォールドに播種し、培養を行うことが多い。このような三次元培養系の培養方法や評価方法は、二次元培養系において確立されたものの応用であることが多いが、三次元培養系には以下に示すような、二次元培養系にない特有の問題があり、それらの評価方法への影響について検討する必要がある。

例えば、二次元培養系では一般的に細胞の生着率は高

いため、単純に細胞播種の時の細胞数から培養開始時に生存している細胞数の推定や制御が可能である。しかし、三次元培養系では、スキヤフォールドの種類や播種の方法、使用する細胞数により生着率が大きく異なる^{1~4)}ため、培養開始時であっても生存細胞数を推定することが難しい。にもかかわらず、細胞培養系において最も基本的なパラメータである細胞数を評価する際に、このことを十分に考慮していない文献が散見される。

また、細胞の分布について考察する必要があるのも三次元培養系の特徴である。二次元培養系では、多くの実験系において細胞が二次元的に均一に分布していることが前提となっている。一方、三次元培養系では、その分布が三次元的になるだけでなく、スキヤフォールドの種類や播種の方法により、播種したスキヤフォールドの表

To whom correspondence should be addressed:

Hideyuki Sakoda; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9264;

Fax: 03-3700-1478; Email: sakoda@nihs.go.jp

面付近に細胞が集中するなど、必ずしも均一に分布させることができない。三次元培養系における細胞の増殖や分化といった応答は、スキャフォールドの材質やデザイン、成長因子などはもちろん、細胞密度などにも影響される⁵⁾ことが知られており、細胞数や細胞分布の評価は、三次元培養系では特に重要となってくる。

これらのパラメータの評価には、前述のように二次元細胞培養系において確立された方法を応用することになるが、スキャフォールドの存在のために適用が困難なものもあるため、そのスキャフォールドの評価系への影響についてあらかじめ考察しておく必要がある。特に、親水性のゲル状やスポンジ状のスキャフォールドでは、その内部に含まれる溶液を完全に除去することが困難であるため、様々な評価系においてその溶液の存在が問題になることが考えられる。

本研究では、三次元培養系における適切な細胞数の評価方法の検討と、スキャフォールドによる影響について、ヒト正常軟骨細胞と三次元コラーゲンスキャフォールドを使用し考察を行った。さらに、その応用例として、三次元コラーゲンスキャフォールド中で培養した軟骨細胞の増殖についても検討を行った。

2. 材料および方法

2-1 材料

本研究では、ヒト正常軟骨細胞 (Lonza Walkersville, Walkersville, MD, USA)、軟骨細胞用培地 (Lonza)、三次元コラーゲン複合体スキャフォールド (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) をそれぞれ購入して使用した。スキャフォールドは孔径がおおよそ100 μm から200 μm のスポンジ状で、直径約5 mm、高さ約4 mmの円柱状であった。このスキャフォールドに培地を滴下すると、おおよそ50 μL の培地を保持した。

2-2 DNA量からの細胞数推定の検証

所定の細胞密度の細胞懸濁液を、スキャフォールドが保持できる培地量である50 μL 滴下したスキャフォールドを試料とした。

DNA量の測定は直接法とコラーゲナーゼ法の二つの方法で行った。直接法では、試料に界面活性剤 (0.2 %, Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加えたTE緩衝液 (10 mmol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 1 mmol/L エチレンジアミン四酢酸, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を1 mL添加し、超音波処理により細胞を破壊した。この溶液100 μL にDNAと結合する蛍光試薬 (PicoGreen, Invitrogen) を加え、その蛍光強度からDNA量を決定した。コラーゲナーゼ法では、まずハンクス液 (日水製薬, 東京) にコラーゲナーゼ

A (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) を0.1%加えた溶液を試料に500 μL 加え、37°Cで1時間振とうすることで、スキャフォールドを分解した。次に、0.4%の界面活性剤溶液を500 μL 加え、直接法と同様の測定を行った。

2-3 細胞の播種及び細胞分布の観察

スキャフォールドには、滴下法と遠心法の二種類の 방법으로細胞を播種した。滴下法では、50 μL の培地に1~8 $\times 10^4$ の細胞が含まれるよう調製し、マイクロピペットでスキャフォールドの上にゆっくりと滴下して播種した。遠心法では、15 mLのプラスチック遠心管に約1 $\times 10^7$ の細胞を含む細胞懸濁液10 mLとスキャフォールドを入れ、180 $\times g$ で2分遠心した⁴⁾。遠心後は懸濁液をよく攪拌して遠心を再度行い、合計4回遠心を行って細胞を播種した。

細胞分布はcalcein-AMとethidium homodimer-1からなる蛍光色素 (Live/Dead Kit, Invitrogen) により評価した。calcein-AMは、細胞内に取り込まれ、エステラーゼにより強い緑色の蛍光を発するcalceinに加水分解される。Calceinは細胞膜を透過しないため、結果的に生細胞のみが緑色に染色される。これに対しethidium homodimer-1は、細胞膜損傷部から進入して核酸と結合するため、死細胞のみが強い赤色の蛍光を発する。細胞を播種したスキャフォールドを所定時間培養した後、1.6 $\mu\text{mol/L}$ のcalcein-AMと4 $\mu\text{mol/L}$ のethidium homodimer-1を含む培地で10分程度培養し、スキャフォールド表面の観察を行った。その後、スキャフォールドをメスで切断し、断面を観察した。

なお、対照の二次元培養では5~80 $\times 10^3$ /wellの細胞を24ウェルプレートに播種し、同様の検討を行った。

2-4 非破壊的方法による細胞数評価

二次元及び三次元で播種した細胞を一晩培養した後、非破壊な方法による細胞数評価を行った。具体的には、細胞の活性により化学変化して生じる蛍光、あるいは吸光により細胞数の測定が可能となる、TetraColor ONE (生化学工業, 東京) 及びamarBlue (Invitrogen) の二種類の試薬を使用した。これらは、細胞毒性が低いため、測定後も培地交換することにより継続して培養が可能であり、三次元培養系に適用できればその有用性は高い。ただし、細胞あたりの活性が一定であることを前提として細胞数を推定するものであり、間接的な評価方法といえる。

ここでは、二次元及び三次元で播種した細胞を一晩培養した後、培地をそれぞれの試薬を10%含むものに交換し、2または6時間培養後に蛍光強度あるいは吸光度を

測定した。

非破壊的方法で評価を終えた試料についても、前述の方法でDNA量の測定を行った。予め作成した検量線を用いてDNA量から換算した細胞数と非破壊的方法で推定された細胞数とを比較検討し、非破壊的方法による細胞数評価の妥当性を評価した。

2-5 三次元培養における細胞増殖の非破壊的評価

滴下法および遠心法でスキャフォールドに播種した細胞の増殖をalamarBlueで評価した。滴下法では 8×10^4 の細胞を含む細胞懸濁液50 μ Lを滴下して播種した。比較のため二次元培養についても同様の実験を行った。二次元培養では $1 \sim 8 \times 10^4$ /wellの細胞を24ウェルプレートに播種した。それぞれ播種後1, 4, 7, 14日目の細胞数をalamarBlueにより経時的に評価した。

2-6 混入物によるDNA量測定への影響

DNA量測定の際に混入する可能性のある物質による測定への影響について検討を行った。TE緩衝液に培地およびコラーゲン分解物をそれぞれ10%添加したものを試料とした。また、超音波処理により発生したスキャフォールド断片、液体コラーゲン (3 mg/mL, 新田ゼラチン, 大阪市), 0.1%コラーゲナーゼ液についても調べた。これらの試料に蛍光試薬 (PicoGreen) を加え、DNA量測定と同様に蛍光強度を測定した。

2-7 試薬の溶出速度の予備検討

スキャフォールド内部における拡散速度が測定に影響を与える可能性が考えられたため、TetraColor ONEとalamarBlueのスキャフォールドからの溶出速度について予備検討を行った。具体的には、還元状態にしたそれぞれの試薬に浸漬しておいたスキャフォールドを新しい培地に移し、培地の吸光度あるいは蛍光強度を経時的に測定した。

3. 結果

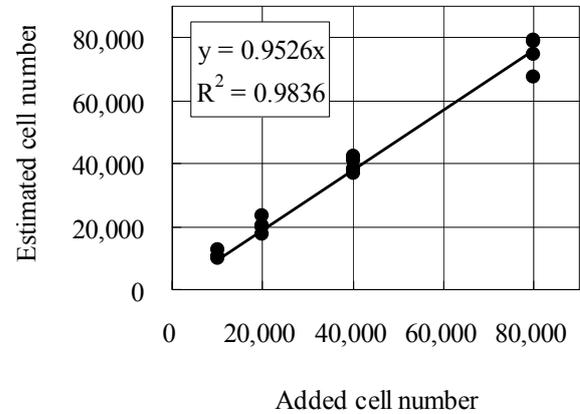
3-1 DNA量からの細胞数推定の検証

今回使用したコラーゲンスキャフォールドは、一度培地を含むと培地を除去することが困難であった。そのため、細胞懸濁液のみの場合も含め、50 μ Lの培地を含んだ状態で測定を行った。

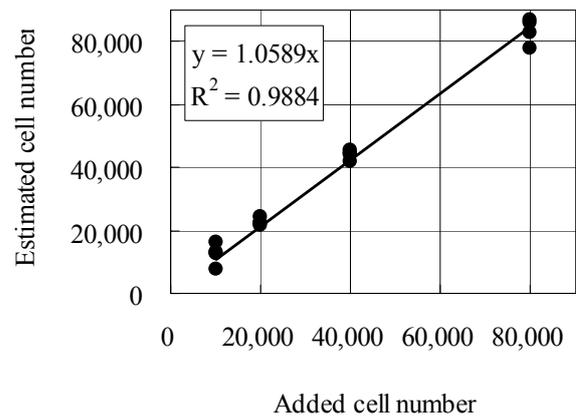
細胞懸濁液のみの場合、細胞数とDNA量の間に明瞭な相関が認められた (図示していない) ので、これ以降はこの関係を用いてDNA量を細胞数に換算した。

Fig. 1に細胞懸濁液とスキャフォールドの混合物について、直接法、コラーゲナーゼ法でDNA量を測定した結果を示す。いずれの方法でも、混合物に添加した細胞数

と、DNA量から推定された細胞数がほぼ一致し、DNAや試薬のコラーゲンへの吸着などの影響はないと判断できたため、以後の測定は直接法のみで行った。



(a) Direct method



(b) Collagenase method

Fig. 1 Relationship between added cell numbers and estimated cell numbers in mixtures of cells and scaffolds by DNA quantification

3-2 細胞播種法の違いによる細胞分布の検証

Fig. 2およびFig. 3に二次元培養、滴下法による三次元培養、遠心法による三次元培養における細胞分布を示す。二次元培養では生細胞 (緑色) が多くみられ (Fig. 2 a), 死細胞 (赤色) は観察されなかった (Fig. 3 a)。滴下法ではスキャフォールド表面に多くの生細胞が観察された (Fig. 2 b) が、断面では生細胞は観察されなかった (Fig. 2 d)。この時、赤色蛍光も観察された (Fig. 3 b) が、細胞を含まないスキャフォールドでも同程度の赤色蛍光が観察された (Fig. 3 c) ため、この蛍光はスキャフォールド由来のものと考えられた。遠心法ではスキャフォールド表面 (Fig. 2 c) だけでなく、断面にも生細胞が観察され (Fig. 2 e), 内部にも細胞が入

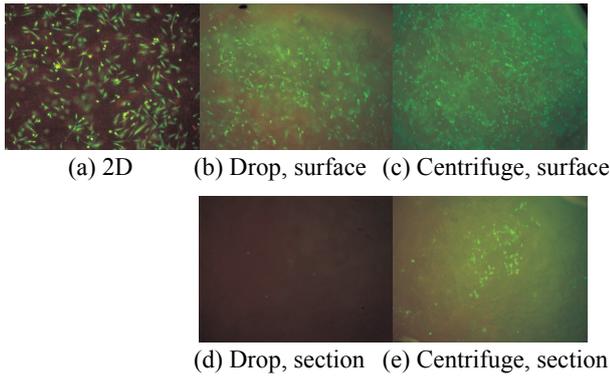


Fig. 2 Cell distribution in (a) two-dimensional culture ($\times 100$) and (b)-(e) three-dimensional culture ($\times 40$)

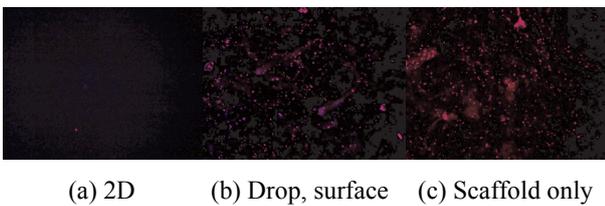


Fig. 3 Distribution of red fluorescence (dead cell marker) in (a) two-dimensional culture, (b) three-dimensional culture and (c) scaffold only ($\times 100$)

り込むことがわかった。死細胞については滴下法の場合と同様の像（図示していない）が観察された。

3-3 細胞数評価

二次元培養の場合は、非破壊的細胞数評価法の試薬の呈色量もDNA量とよく比例する（図示していない）ことがわかった。そこで、この比例関係を用いて試薬の呈色量から細胞数への換算を行った。Fig. 4に二次元培養及び三次元培養の細胞数の測定結果を示す。横軸はDNA量測定から換算した細胞数を、縦軸は試薬の呈色量から求められた細胞数である。

TetraColor ONEを使用した場合、三次元培養では二次元培養に比べ呈色量が減少し、その結果、DNA量測定から推定された細胞数に比べ細胞数が少なく推定されることが示された。この傾向は培養時間を長くしても変わらなかった。これに対し、alamarBlueを使用した場合は、三次元培養でも二次元培養と同程度の蛍光強度を示し、DNA量測定から推定された細胞数とほぼ一致することが示された。また、培養時間の影響、さらには、三次元培養における播種方法の違いによる影響はほ

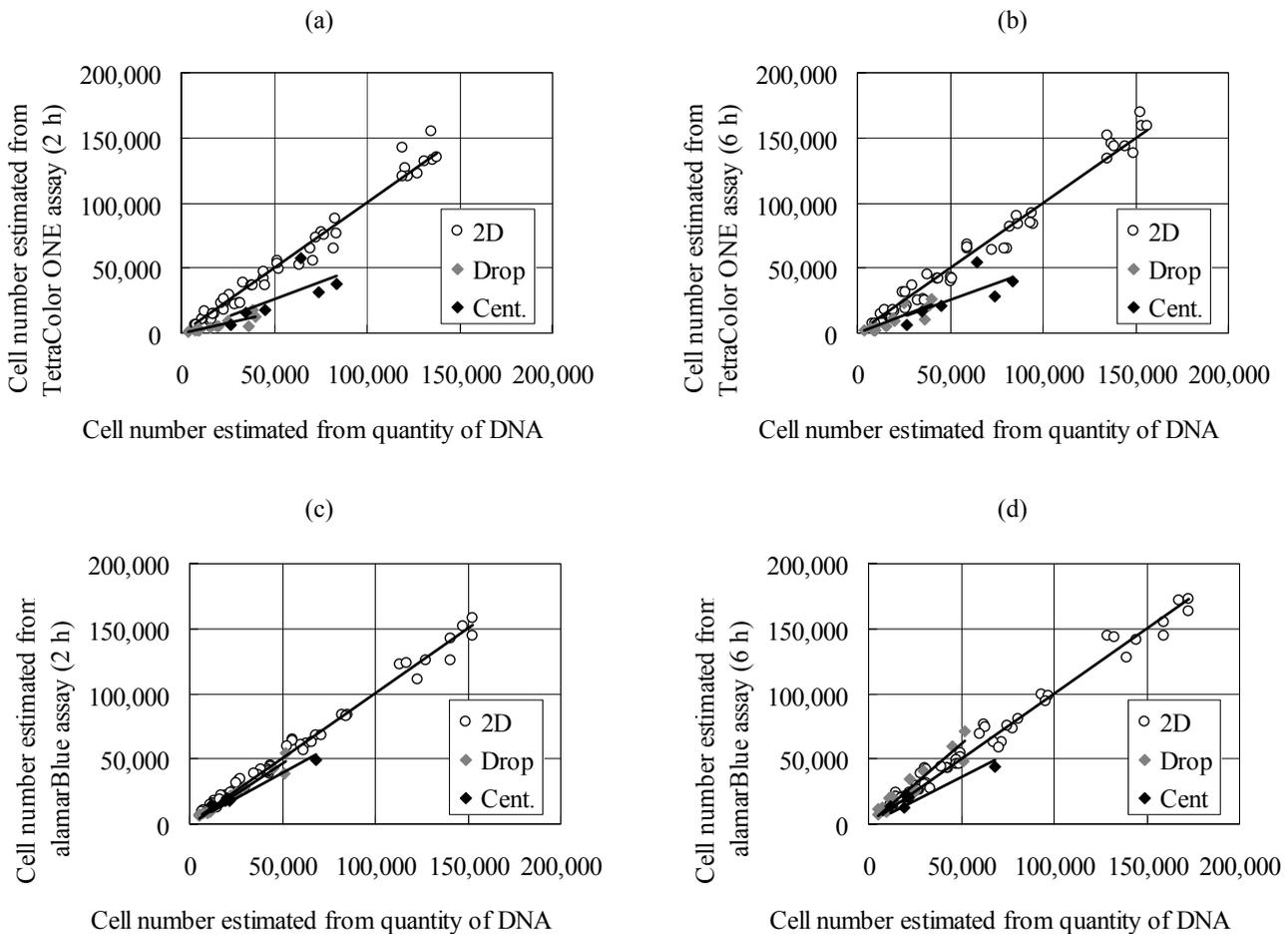


Fig. 4 Relationship between estimated cell numbers from non-destructive methods (TetraColor ONE assay and alamarBlue assay) and those from the measurements of quantity of DNA

とんど見られなかった。

3-4 三次元培養における細胞増殖の非破壊的評価

Fig. 5 に三次元培養における細胞増殖を経時的に評価した結果を示す。二次元培養では細胞数が急速に増加し、播種に用いた細胞数にもよるが7日目以降より細胞が培養容器をほぼ完全に覆って増殖が停止した状態（コンフルエント）になることがわかった。それに対して三次元培養では、培養初期から後期までほとんど細胞数が変化しないことがわかった。

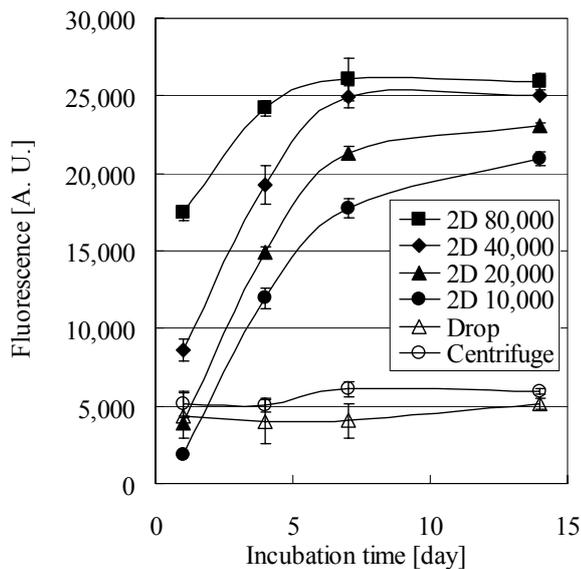


Fig. 5 Cell proliferation in 2D-culture (added cell numbers: 1, 2, 4, 8×10^4) and 3D-culture ($n = 3-4$).

3-5 混入物によるDNA量測定への影響

培地とコラーゲン分解物はそれぞれ10%の混入で細胞数600と3,000に相当する蛍光を示した。また、スキャフォールド断片、液体コラーゲン、0.1%コラゲナーゼ液は、それぞれ細胞数10,000程度に相当する蛍光を示すことがわかった。

3-6 試薬の溶出速度の予備検討

Fig. 6 に試薬の溶出速度の測定結果を示す。平衡に達するまでの時間は、TetraColor ONEでは、約30分であったのに対し、alamarBlueでは約10分であった。

4. 考察

DNA量から細胞数を推定する方法は、細胞を破壊する必要があり、同一試料による経時的な測定ができないという短所があるが、細胞数を直接的に評価できるため、第一の選択肢として検討を行った。

今回使用したスキャフォールドは、培地と接触すると

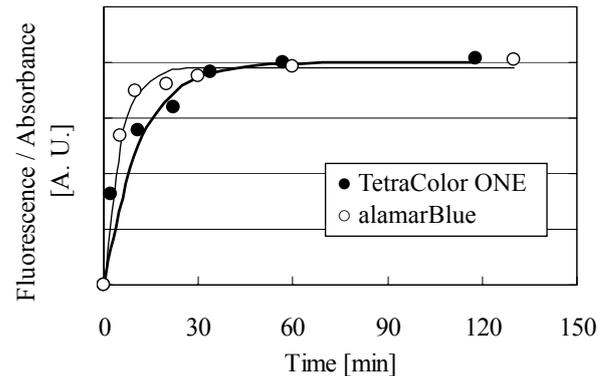


Fig. 6 Elution of the reduced forms of TetraColor ONE and alamarBlue from the scaffolds ($n = 1$)

数秒から十数秒で培地を吸収し、保持した。呈色試薬を使用した場合は、測定後に培地交換を行ってもスキャフォールドは呈色したままであり、試薬の除去はできなかった。このようにスキャフォールドの種類によっては洗浄が困難であり、例えば、DNA量を測定する場合でも培地の混入が避けられないため、これを想定した取り扱いが必要である。混入の可能性のある、培地、スキャフォールド断片、コラーゲン分解物、コラゲナーゼ液は、いずれも蛍光試薬を使用したDNA量測定の際に蛍光を示すことがわかった。これらの影響は、いずれも適切な対照試料を設定することにより相殺することが可能であるが、試験試料中に含まれる細胞数が少ない場合は、大きな誤差の要因になることが示唆された。実際、Fig. 4では、このような混入物による影響を対照試料により相殺しているが、特に低細胞数の領域でばらつきが多かったのは、このことが影響していると思われる。また、ethidium homodimer-1によりスキャフォールドに死細胞の存在を意味する赤色蛍光が観察されたことは、三次元培養系特有の影響が出た一例であり、改めて三次元培養系における各種評価系の事前の検討の重要性を示している。

一方、三次元スキャフォールドへの効率的な細胞播種方法の開発も重要な課題である。これまで、遠心によるもの¹⁾、真空を用いるもの²⁾、スピナーフラスコによるもの³⁾などが提案されている。真空を用いる方法²⁾についても検討を行ったが、今回使用したスキャフォールドでは細胞が播種できなかったため本研究では採用しなかった。そこで滴下法と遠心法についてのみ検討を行ったが、今回使用した条件では、初期の播種密度が低く、細胞の増殖も見られないことから、健全な軟骨組織の再生は難しいと考えられた。播種後の最適な細胞分布については不明なことも多いが、スキャフォールド内部の細胞数や細胞分布を確認しながら、スキャフォールドの材質、デザイン及び播種方法を工夫することで、細胞分布

の最適化を検討する必要があると思われる。また、スキャフォールドが細胞毒性を有する可能性も否定できない。その場合には、スポンジ状のスキャフォールドでは、体積当たりの表面積も大きいことに注意が必要と考えられる。

スキャフォールドからのTetraColor ONEと alamar-Blueの溶出速度は、TetraColor ONEでは約30分、alamar-Blueでは約10分と大きく異なった。スキャフォールド内部への試薬の浸透とそこからの溶出に往復の時間がかかることや、その間も還元反応が積算されていることから、数時間の試験時間ではこの溶出速度の差の影響は非常に大きいものと考えられた。今後、さらに検討をする必要があるが、TetraColor ONEの呈色成分であるテトラゾリウム塩 (WST-8) の分子量は約600で、alamar-Blueの分子量約200に比べ大きいことが、溶出挙動に違いがみられた主な原因と考えられる。

その他の違いとして、alamarBlueの酸化還元電位が+0.38 Vであり、TetraColor ONEの電子キャリアー (1-methoxy PMS) の酸化還元電位+0.063 Vに比べ高いため、NADHなどだけでなく、シトクロムによっても還元されることが考えられたが、呈色挙動の違いとの関連性は不明である。

このように、三次元培養における細胞挙動は二次元培養の時と異なる可能性が示されたため、1細胞あたりの活性が一定であることを前提とした非破壊的な細胞数推定方法が三次元培養にも適用可能かどうかについては、さらなる検討を要するところであり、今後の課題である。

引用文献

- 1) Yang, T. H., Miyoshi, H. and Ohshima, N.: *Journal of Biomedical Materials Research*, 55, 379-386 (2001)
- 2) Solchaga, L. A., Tognana, E., Penick, K., Baskaran, H., Goldberg, V. M., Caplan, A. I. and Welter, J. F.: *Tissue Engineering*, 12, 1851-1863 (2006)
- 3) Vunjak-Novakovic, G., Obradovic, B., Martin, I, Bursac, P. M., Langer, R. and Freed, L. E.: *Biotechnology Progress*, 14, 193-202 (1998)
- 4) Li, Z. and Zhang, M.: *Journal of Biomedical Materials Research*, 75A, 485-493 (2005)
- 5) Lin, Z., Willers, C., Xu, J. and Zheng, M. H.: *Tissue Engineering*, 12, 1971-1984 (2006)