

細胞剥離を低減するマイクロプレートの開発

Development of a Microplate that Reduces Cell Detachment

梅林 志浩*・木村勝典**

Yukihiro Umabayashi and Katsunori Kimura

* 食品開発研究所 アグリ食品科、** 機械素材研究所 計測制御科

細胞培養試験に用いられるマイクロプレートには、培地交換の際にウェル底の細胞が剥がれ易いという欠点がある。筆者らは、ウェル形状による細胞剥離制御の検証のため、形状の考案、3Dプリンターによる試作容器作製及び培養細胞による性能評価を行った。48 ウェル又は 96 ウェルプレートのウェルサイズを基準に試作容器を作製し、HEK293 細胞を播種し付着させた後にギムザ染色及び BCA assay により剥離試験を行った結果、細胞剥離は通常のウェルに比べ約 96%抑制された。

The microplate used for cell culture tests has a disadvantage that the cells at the bottom of the wells are liable to be detached during medium exchange. In order to verify whether cell detachment can be controlled by the shape of the well, the authors designed a well, made a prototype well plate with a 3D printer, and conducted a performance test using cultured cells. The prototype well plate was prepared based on the size of a 48-well or 96-well plate. The plate was seeded with HEK293 cells and subjected to a cell detachment test after adhesion of the cells to the plate using Giemsa staining and BCA assay. The result showed that the prototype well plate reduced cell detachment by approximately 96% compared with an ordinary well plate.

1. はじめに

培養細胞を用いた各種評価実験では、実験の効率化のために使い捨てのプラスチック製培養容器が用いられるのが一般的であり、短時間でより多くの検体を評価するために様々な工夫がなされてきた。マイクロプレートは複数の培養室（ウェル）を 1 枚のプレートにまとめることで操作性を高めた実験器具で、外形は約 85mm×125mm でウェルの数は 6、12、24、48、96 など様々であり、実験の目的によって使い分けられている。実験のハイスループット化の目的で用いられるものとしては 96 ウェルタイプが最も普及しており、関連製品も多数開発されている。

マイクロプレートの原料には、ポリスチレンやポリプロピレン、ポリエチレン等が使われている。これらの素材は疎水性であり、付着性の細胞では付着率が低下するため、培養面を親水性にするためにプ

ラズマ処理等の表面処理が施されている¹⁾。上皮系細胞など比較的付着能の高い細胞は培養容器の培養面に伸張し強固に付着するため培地交換や PBS 等での細胞洗浄の際に細胞が剥がれることは稀であるが、血球系細胞や神経細胞等の比較的付着能の低い細胞は培地交換の際に細胞が剥がれることがある。

細胞の付着力を高めるために、コラーゲン等の高分子を培養面に塗布する方法がある。コラーゲンは細胞の足場となり²⁾、培地交換の際の水圧、剪断力等による剥離が抑えられる。しかし、接着力の弱い細胞全てに効果がある訳ではないこと、使用期限が短いこと、高価である等の問題がある。

筆者らは、マイクロプレートのウェル形状の工夫により細胞剥離を制御できないかと考え、CAD による形状設計、3D プリンターによる試作及びギムザ染色等による細胞剥離性評価試験を行い、ウェル形状

と細胞剥離の関係について検証したので報告する。

2. 実験方法

2.1 試作造形

ウェルの試作には、3DCAD ソフト（ダッソー・システムズ社製 SolidWorks）及び3Dプリンター（キーエンス社製 AGLISTA-3100）を使用した。造形樹脂は半透明アクリルを用いた（図1）。サポート剤除去後の造形器物表面をサンドペーパー及びコンパウンドで研磨し、190°Cの乾燥機で6時間保持した。乾燥機中で室温になるまで放置した後、超純水、エタノールの順に超音波洗浄を行い自然乾燥させた。



図1 AGLISTA-3100（左）及び造型物（右）

2.2 細胞剥離性評価試験

2.2.1 細胞培養

細胞はヒト胎児腎細胞 293 (Human Embryonic Kidney cells 293; HEK293) を用いた。細胞を培養器に播種（48 ウェルサイズ： 1.2×10^5 個/well、96 ウェルサイズ： 5×10^4 個/well）した後、37°CのCO₂インキュベーターで1~2日間培養した。細胞がウェル底面に付着したことを確認し、培地の吸引注入操作を行った。操作後の細胞剥離の有無は位相差顕微鏡により簡易的に確認した。

2.2.2 ギムザ染色

培地を吸引除去したウェルに細胞固定液として1%グルタルアルデヒド含PBS(-)溶液75μLを静かに添加した後、室温で30分間静置した。固定液を全て除去した後、ギムザ染色液（和光純薬社製）75μLを静かに添加した後、室温で1時間静置した。ギムザ染色液を全て除去した後、実体顕微鏡により観察した。

2.2.3 BCA assay

培地注入操作で剥離した細胞をマイクロチューブに回収し、PBS(-)にて3回洗浄した後、超純水50μLを添加し3分間超音波破碎した。5,000rpmで3分間遠心した後、上清50μLを別のマイクロチューブに取り、BCA試薬（タカラバイオ社製）を50μL添加した。60°Cの恒温槽で20分間反応させた後、アッセイプレートに移しマイクロプレートリーダーにて562nmの吸光度を測定した。

3. 結果と考察

3.1 細胞剥離試験

マイクロプレートのウェル底面形状としては、円形又は四角形が一般的であり、特に細胞培養用のプレートに関してはその多くが円形である。手動での操作では、ウェル数が96までのプレートが一般的に用いられる。

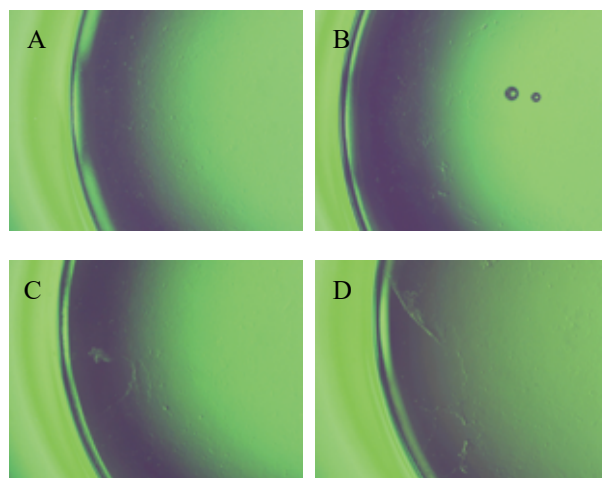


図2 HEK293細胞の位相差顕微鏡像

96ウェルマイクロプレートに播種し24時間培養後培地交換した。A) 培地交換前、B) アスピレータで培地除去後、マイクロピペットで培地添加、C) マイクロピペットで培地除去後、培地添加、D) マイクロピペットで培地除去後、培地添加×2回

図2は、市販の細胞培養用96ウェルマイクロプレートにHEK293細胞を播種し一晩培養した際の位相差顕微鏡像である。HEK293は付着性の細胞であり基材に付着・延伸して増殖する（図2A）が、他の上皮系細胞等に比べて付着力が弱いいため培地交換等の操作により基材から容易に剥離する（図2B-D）。

本研究では全ての実験でピペットを右手に持ち、ウェル左側の内壁にピペットチップ先端が当たるように操作しているため、図2では培地交換時にピペットの先端部分を起点に細胞が剥がれ始め、以降、培地の吸引・注入回数の増加と共に剥離領域が拡大していることが確認できる。剥離起点の形成要因としては、ピペット先端部の細胞への接触又はピペットから注入される培地水圧が考えられる。実験ではピペット先端及び注入液が直接細胞に当たらないウェル形状を検討し、図3に示す基本構造を考案した。

本形状はピペット先端の案内溝及び案内溝底面と培養面を隔てる凸形状から構成されている。本研究では、市販の48ウェルプレート及び96ウェルプレートのウェルサイズを基準として試作ウェルを設計した。図中の矢印はピペットから排出される液体の流れを想定したものであり、培養面の細胞（図中では青色の楕円）にピペットからの注入液が直接当たらない構造となっている。

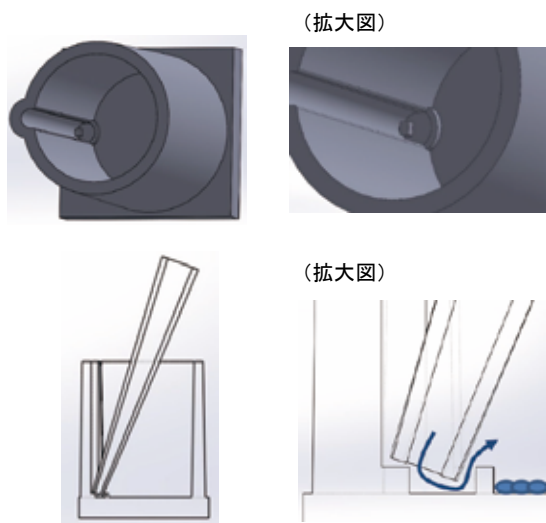


図3 試作ウェル形状の一例
上) 立体図、下) 断面図

図4は試作ウェルに細胞を播種し一晚培養した後、培地を除去しPBS(-)を添加した際のギムザ染色像である。比較対象として通常形状のウェルも併せて造形し評価した。通常形状(図4A)においては一回の吸引注入操作により細胞が剥離したのに対して、図3の基本構造を有する形状(図4B)では吸引注入操

作を繰り返しても培養面の細胞の剥離は認められなかった。尚、案内溝底面に付着した細胞は一回目の吸引操作によってほぼ全て取り除かれた。一方、案内溝底面を培養面より0.3mm高くしたウェル(図4C)及び0.6mm低くしたウェル(図4D)、また図3のような凸形状を無くしたウェル(図4F)では一回の吸引操作によってシート状に細胞が剥離した。また、案内溝底面と培養面を凸形状で隔てただけのウェル(図4E)でも細胞の剥離が見られた。

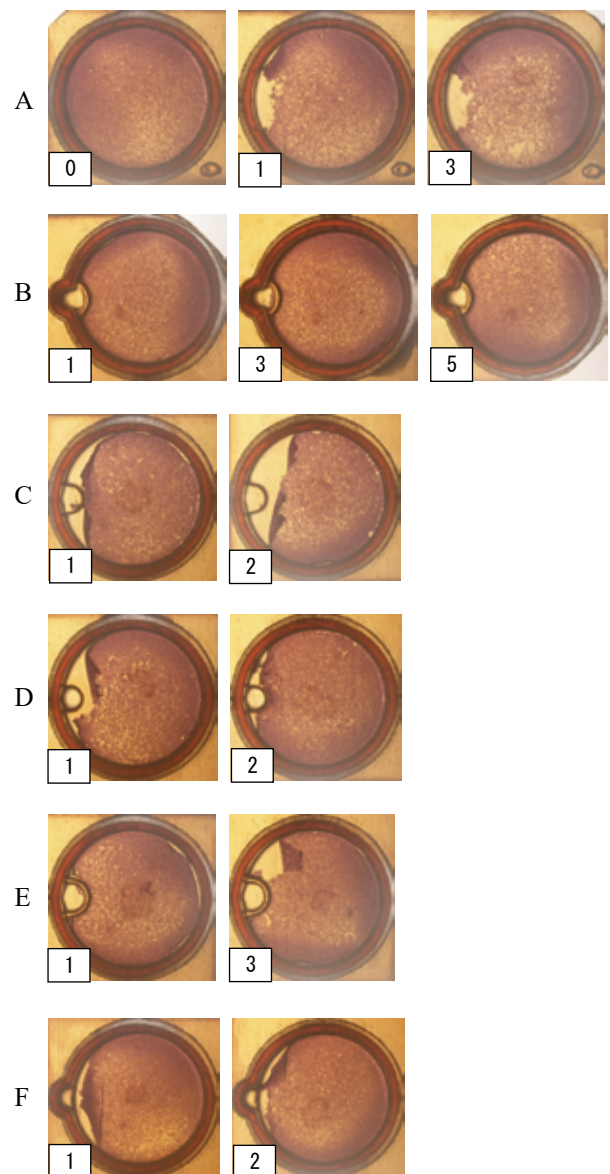


図4 ギムザ染色細胞の実体顕微鏡像
48ウェルサイズの試作品に細胞を播種し24時間培養後吸引注入操作を行った。A) 通常形状、B-F) 試作形状。枠内の数字は吸引注入操作回数

プラスチック製培養容器は通常、コスト面から射出成形で製造されている。この方法ではあらかじめ作製した金型に高温で熔融させたプラスチック原料を流入させた後、金型を冷却しプラスチックを固める。生産効率を高める為にはこの一連の工程を数秒～数十秒の間に完了させることが重要であり、一方で製造歩留まりを高める為に不良品発生率の抑制が求められる。成形不良の発生要因は様々であるが、主要な要因の一つに製品形状がある。本実験で設計したウェルでは最も微小な凸形状部においても0.3mmであり、金型製作において技術的問題が生じる可能性は低いと思われる。しかし、96ウェルプレートの製造を想定した場合、特に成形段階での不良発生を十分考慮して製品設計を行う必要がある。図4に示した結果では、細胞剥離抑制の為に案内溝底面と培養面を隔てる凸形状が重要であることが示されている。一方で、ピペットの先端を所定の位置までガイドする為の案内溝は細胞剥離抑制の為に必ずしも必要ないことも示唆されている。また、培養面の一部に凹形状を設けることで凸形状の機能を代替できれば形状として最もシンプルであり、成形時の充填不足等の不良発生の確率を低減できると思われるが、本実験より細胞がシート状に剥離したことから、現段階では培養面と非培養面を隔てる何らかの構造が必要であると考えられる。

3.2 BCA assay

細胞剥離の状態を直接観察する方法としてギムザ染色は有効な手段であるが、ギムザ染色では剥離エリアを目視あるいは比較的低倍率の顕微鏡で確認するため、一定以上の細胞の剥離が必要となる。そこで、より感度の高い識別法としてBCA assay (bicinchoninic acid assay)での検証を行った。本法はタンパク質の定量法として一般的に用いられており、細胞数の間接的指標となる³⁾。図5AはBCAによる呈色反応の結果であり、上段はスタンダードとして用いたウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin; BSA; 左から 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 50, 100 μ g/mL)、下

段は各濃度の細胞抽出サンプル (左から 1.5, 3, 6, 15, 30, 60, 120, 240 $\times 10^2$ cells) を示す。これらの結果より細胞数とBSA濃度の相関を確認した (図5B, C)。

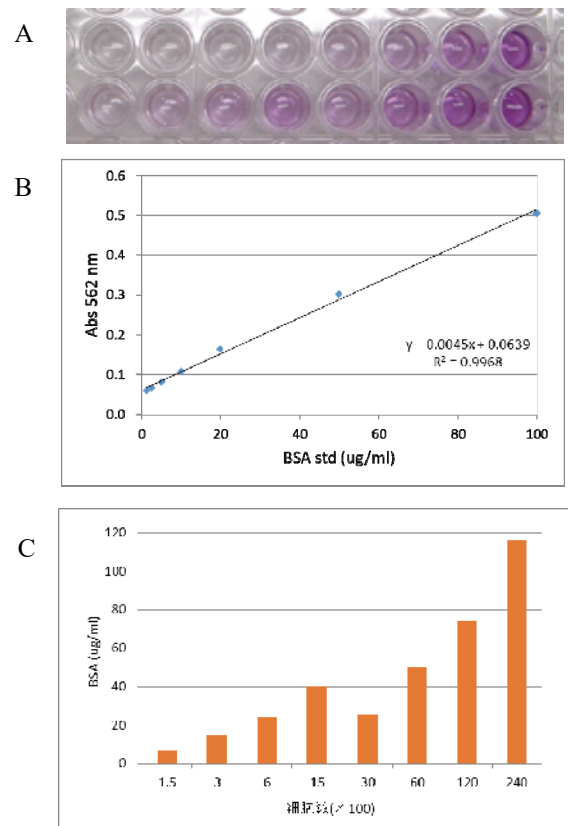


図5 BCA assayによる細胞数測定

A) BCA 呈色反応の結果 (上段: ウシ血清アルブミン (BSA)、下段: 細胞抽出サンプル)、B) BSA の検量線、C) BSA 換算

図6に市販の96ウェルプレートでの剥離試験の結果を示す。PBS(-)での吸引注入操作の回数は左から0回、1回、3回、4回であり、操作回数の増加と共にBSA換算値が増加することが確認できた。また、本法はピペット先端から離れた場所の細胞剥離の程度を評価する際にも有用と考えられる。

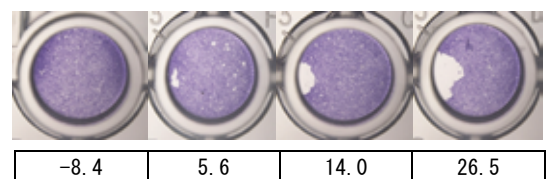


図6 ギムザ染色像及び剥離細胞のBSA換算値

96ウェルマイクロプレートに細胞を播種し24時間培養後に剥離試験を行った。左から、PBS(-)吸引注入操作0回、1回、3回、4回。数字は剥離細胞のBSA換算値

図7は、試作ウェルについて BCA assay により剥離細胞の割合を算出した結果である。3 回の吸引注入操作後の試作形状での剥離細胞の割合は、通常形状の約 4%に抑えられることが確認された。試作形状では、細胞播種後に案内溝底面にも細胞が付着するものの、1 回の培地交換で案内溝底面の細胞をほぼ全て取り除くことができ、一方で、培養面と隔てる凸形状により案内溝底面への細胞の進入を阻止できると考えられる。

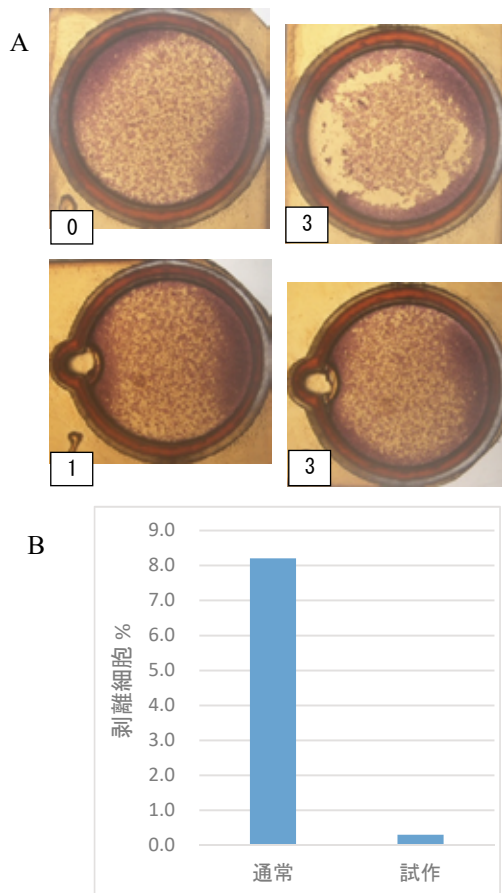


図7 試作ウェルによる剥離試験

48 ウェルサイズの試作品に細胞を播種し 24 時間培養後吸引注入操作を行った。A) ギムザ染色像 (上段: 通常形状、下段: 試作形状。枠内の数字は吸引注入操作回数) B) BCA assay による剥離細胞割合の算出値

4. おわりに

本研究では、既存の実験器具の課題解決を目的として、器具の設計から 3D プリンターによる試作、試作品の性能試験までを一貫して行い、各工程において新たな知見を見出した。本研究成果については、特許出願を行った。今後は更にウェル形状の改良を

進め、剥離抑制機能を高めていくと共に、製品化を見据えて次の段階に向けて研究を進めていく予定である。

文献

- 1) Eroshenko D. et al.; The role of plasma, albumin, and fibronectin in Staphylococcus epidermidis adhesion to polystyrene surface, *Curr Microbiol*, 70(6), p.846-53(2015).
- 2) N. Davidenko et al.; Evaluation of cell binding to collagen and gelatin: a study of the effect of 2D and 3D architecture and surface chemistry, *J Mater Sci Mater Med*. 27(10), 148(2016).
- 3) 三重ら; バイオ関連分野での基礎-細胞数測定法, *Electrochemistry*, 76 (12), p.924-927(2008).

