

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05031

研究課題名（和文）交流電解ゾル-ゲル反応を基にした生体成分の三次元集積とその医療応用

研究課題名（英文）Three-dimensional accumulation of biological components based on sol-gel reaction using AC electrolysis and its biomedical applications

研究代表者

吉岡 朋彦 (Yoshioka, Tomohiko)

岡山大学・ヘルスシステム統合科学学域・准教授

研究者番号：50452016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、細胞やタンパク質といった生体成分を交流電場によって集積させつつ、それらを交流電場下での水の電気分解反応生成物を触媒として形成する足場材料に包括し、安定化する技術開発を目的として行った。細胞モデル（細胞と大きさ・電荷が類似するポリスチレンビーズ）やタンパク質を、交流電場下で形成するシリカゲルに包括できることを見出した。さらに、足場材料として生体活性ゲルを交流電場下で形成できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、交流電場下で生体成分の集積の足場となる無機ゲルを形成させつつ、細胞モデルやタンパク質が電場を用いて集積できることを明らかにした。これは無機ゲルを足場材料とした生体成分の三次元集積を可能にする新しいプロセスである。再生医療技術や、細胞を複合化したデバイス、バイオセンサなどの新しいプロセスングとして期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a technology to accumulate biological components, such as cells and proteins, three-dimensionally by incorporating them into scaffold materials formed by the sol-gel reaction of silicon alkoxides under the application of AC electric fields. It was demonstrated that cell models (polystyrene beads similar in size and charge to cells) or proteins can be incorporated into silica gels formed under AC electric fields. Furthermore, novel bioactive gels obtained by the sol-gel reaction under AC electric fields were developed as scaffold materials.

研究分野：バイオマテリアル

キーワード：ゾル-ゲル 電気分解 交流

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、iPS 細胞等の幹細胞研究が急速に進歩し、再生医療の実現に期待が高まっている。しかし、細胞はヒト組織・臓器と同様に三次元に組み上げなければ、立体的な組織・臓器の再生医療は実現しない。細胞やタンパク質といった生体成分を三次元的に集積させていく技術開発が求められる。

細胞やタンパク質といった生体成分は電荷を帯びているため、三次元集積に電場を用いることは有用である。細胞やタンパク質の懸濁液に電場を印加することで、一方の電極へ向かって電気泳動することで迅速に集積させることができると考えられる。しかしながら、直流電場を印加すると、懸濁液中で水の電気分解反応が激しく起こって pH が変化することで、細胞やタンパク質にダメージを与える可能性が指摘されている[1]。この解決策として、交流電場の使用が検討されている。我々はこれまでに、交流電場で水の電気分解反応を抑制しながらタンパク質を電気泳動堆積できることを報告した[2]。一方で、タンパク質の電気泳動堆積後、電極表面でタンパク質が変性することも明らかとなった。これはタンパク質単独の堆積が原因と考えている。

生体内では、細胞は細胞外マトリックス (ECM) を足場として三次元的に組織化され、組織や臓器ができていくこと考えると、細胞やタンパク質といった生体成分の集積には足場となる材料が共存することが望ましいと考えられる。

生体成分を安定に包括できる材料として無機ゲルがある。特にシリカゲルの有用性が知られている[3]。シリカゲルは水の電気分解反応を利用して迅速 (~1 分程度) で電極表面に形成させることができる。これはシリコンアルコキシドのゾル-ゲル反応において、水の電気分解反応で生成する水酸化物イオンを、あらかじめ加水分解されたシリコンアルコキシドの縮合反応の触媒として利用する方法である[4]。この方法では反応中にタンパク質を共存させると、ゾル-ゲル転移に伴い、タンパク質がシリカゲル中に包括されることも報告されている[5]。

最近、我々はこのような電解ゾル-ゲル反応を交流電場下でも進行させ、シリカゲルを形成できることを見出した。このような背景から、無機ゲルのゾル-ゲル反応に細胞やタンパク質といった生体成分を共存させ交流電場を印加することで、生体成分を集積しながら、その足場となる無機ゲルを形成させ、生体成分の三次元的集積を達成できるのではないかと着想した。

2. 研究の目的

本研究は、細胞やタンパク質といった生体成分を外部電場によって集積させつつ、それらを外部電場をトリガーとして形成する足場材料に包括し安定化する技術開発を目的として行った。足場材料として無機ゲルに着目した。無機ゲルは、水の電解反応で生成する水酸化物イオンを触媒としてシリコンアルコキシドのゾル-ゲル反応を進めることで得られる。交流電場下での無機ゲルの形成および生体成分の集積挙動に着目して検討を行った。

3. 研究の方法

(1) 交流電場下でのシリカゲルの形成と細胞モデルの包括

細胞のモデルとして大きさ・電荷が類似するポリスチレン (PS) ビーズ[6]を用い、交流電場下で電解ゾル-ゲル反応を進行させて、シリカゲルを形成させるとともに PS ビーズを包括させた。テトラエトキシシラン (TEOS) を原料とし、エタノール、硝酸カリウム、塩酸、水を混合してゾルを調製した。ゾルに PS ビーズを添加した。反応電極にはチタン (Ti) シート、対極に白金 (Pt) シートを用い、ゾルに浸漬させてファンクションジェネレータに接続した。電圧を非対称に設定した交流波形 (矩形波、三角波、正弦波) を周波数 0.1 Hz ~ 10 kHz の範囲で数分間印加した。

(2) 交流電場下で形成するシリカゲルの細胞適合性

交流電場下で形成させたシリカゲル表面で、ヒト骨肉腫由来骨芽細胞 (MG63) を培養した。MTT アッセイにより細胞増殖を評価した。

(3) 交流電場下でのシリカゲルへのタンパク質の包括

モデルタンパク質としてウシ血清アルブミン (BSA) とリゾチームを用いた。TEOS、エタノール、硝酸カリウム、塩酸、水を混合してゾルを調製し、タンパク質を添加した。同様に反応電極に Ti シート、対極に Pt シートを用い、ファンクションジェネレータで交流矩形波を印加した。電圧を非対称に設定した交流矩形波を周波数 100 Hz で 3~60 秒間印加した。タンパク質量は Micro BCA™ Protein Assay Kit を用いて定量した。

(4) ダブルパルス電場を用いたシリカゲルの形成

電解ゾル-ゲル反応では、シリカゲルは核形成・核成長過程を経て形成すると考えられている[7]。そこで電場下でのシリカゲルの形成メカニズムをより深く理解するために、新たにダブルパルス電場を用いてシリカゲルのゾル-ゲル反応を行った。

(5) 生体活性を有するゲルの電解析出

TEOS を原料とした電解ゾル-ゲル反応中に Ca や P を添加することで、Ca や P を含んだ無機ゲルが形成できることを明らかにしている。これらは擬似体液 (SBF) 中でアパタイトを析出させることができるため、生体活性である。そこで、本研究では矩形波パルスや交流電場を用いて、生体活性ゲルの形成を検討した。

4. 研究成果

(1) 交流電場下でのシリカゲルの形成と細胞モデルの包括

調べた交流電場の条件においては反応電極表面にシリカゲルが形成するとともに、細胞モデルとして用いた PS ビーズがシリカゲルに複合化されていることが明らかとなった。このため交流電場を用いて細胞を集積させつつ、その足場としてシリカゲルを同時に形成できる可能性が示された。形成するシリカゲルと集積する PS ビーズの割合を調べたところ、交流周波数の増加とともに、シリカゲルに対する PS ビーズの割合は減少した。一方、交流電圧を増加させると、シリカゲルに対する PS ビーズの割合は増加することがわかった。細胞モデルとして PS ビーズを用いた検討から、交流電圧と周波数の制御によって、シリカゲルの形成量と集積する細胞の割合をコントロールできる可能性が示された。

(2) 交流電場下で形成するシリカゲルの細胞適合性

交流電場下で形成させたシリカゲル上での MG63 細胞を用いた細胞培養試験は、電極として用いた Ti と MTT アッセイの結果は同等で、いずれも培養日数とともに細胞増殖が確認できたことから、交流電場下で形成したシリカゲルには明らかな細胞毒性がないことを確認した。

(3) 交流電場下でのシリカゲルへのタンパク質の包括

等電点が異なる BSA とリゾチームを用いて交流電場下でシリカゲルを形成させたところ、いずれのタンパク質もシリカゲルに包括できることを明らかにした。従来の報告例では直流電場下で BSA を包括できることが示されていたが、本研究によって新たに交流電場も適用できることが示された。タンパク質量は、等電点の高いリゾチームの方が BSA よりもシリカゲルに包括されやすいことがわかり、タンパク質の等電点や大きさによってシリカゲルとの集積挙動が異なることが新たに見出された。

(4) ダブルパルス電場を用いたシリカゲルの形成

シリカゲルの形成メカニズムを調べるため、新たにダブルパルス電場を用いたゾル-ゲル反応を行った。ダブルパルスは二つの異なる電場強度のパルス波を与え、核形成および核成長のそれぞれの過程を制御できる電場である。その結果、シリカゲルには核を形成する電位と核を成長させる電位があることを見出した。このことから交流電圧の設定は、形成するシリカゲルの構造制御に重要であることが示唆された。

(5) 生体活性を有するゲルの電解析出

矩形波パルスや交流電場を用いた場合でも、生体活性を有する無機ゲルを形成できることが明らかとなった。このことから生体成分の足場となる無機ゲルとして、生体活性を有する無機ゲルも使用できると考えられる。また、電解ゾル-ゲル反応中に、Ag や Mg といった成分を添加することで、これらの成分を含有した生体活性無機ゲルが作製できることも明らかにした。Ag はゲルに抗菌性を付与することができ、Mg は形成したゲルの接着性を向上させることができる。

(6) 今後の展望

本研究において、交流電場下で生体成分の集積の足場となる無機ゲルを形成させつつ、細胞モデルやタンパク質が電場を用いて集積できることを明らかにした。これは無機ゲルを足場材料とした生体成分の三次元集積を可能にする新しいプロセスである。今後は実際に細胞を用いたプロセス検討を行っていく必要がある。再生医療技術や、細胞を複合化したデバイス、バイオセンサなどの新しいプロセッシングとして期待できる。

< 引用文献 >

- Seuss et al., *Biomacromol.*, 14, 3355 (2013).
- Braem et al., *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 9, 8533 (2017).
- Dave et al., *Anal. Chem.*, 66, 1120A (1994).
- Shacham et al., *Adv. Mater.*, 11, 384 (1999).
- Harrell et al., *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, 31, 349 (2004).
- Endo et al., *Microchim Acta*, 164, 263 (2009).
- Giordano et al., *J. Electroanal. Chem.*, 784, 153 (2017).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Tomohiko Yoshioka, Takuya Hayashi, and Satoshi Hayakawa
2. 発表標題 The Application of Pulse Electrolysis to the Sol-Gel Deposition of Bioactive Gel Films
3. 学会等名 The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉岡朋彦、林拓哉、早川聡
2. 発表標題 パルス電場を用いた生体活性ゲルの電解堆積とその生体活性評価
3. 学会等名 日本セラミックス協会2020年年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡朋彦
2. 発表標題 水の電気分解反応を利用したセラミックス薄膜の作製
3. 学会等名 日本セラミックス協会第33回秋季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡朋彦、宮本尚紀、早川聡
2. 発表標題 カルシウムを添加したSiO ₂ 系生体活性ゲルの電解析出
3. 学会等名 日本セラミックス協会第33回秋季シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Yoshioka, Naoki Miyamoto, Takuya Hayashi, and Satoshi Hayakawa
2. 発表標題 Electrochemically Generated Sol-Gel Films with Bioactivity on Metallic Substrates
3. 学会等名 11th World Biomaterials Congress (WBC2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉岡朋彦、浅田敏生、片岡卓也、早川聡
2. 発表標題 ダブルパルス電解によるシリカゲルの形成
3. 学会等名 日本セラミックス協会第34回秋季シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡朋彦、Gunawan、片岡卓也、早川聡
2. 発表標題 銀を担持させた生体活性ゲルの電気化学的作製
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会 (43th JSB) および第8回アジアバイオマテリアル学会 (8th ABMC)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	城崎 由紀	九州工業大学・大学院工学研究院・准教授	
	(Shirosaki Yuki)		
	(40533956)	(17104)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ベルギー	KU Leuven			