

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580226

研究課題名(和文)細胞培養の三次元足場材料としてのセルロースヒドロゲル

研究課題名(英文)Cellulose hydrogel for three-dimensional scaffold of cell culture

研究代表者

和田 昌久(Wada, Masahisa)

東京大学・農学生命科学研究科・准教授

研究者番号：40270897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：無灰セルロースを60 wt% 臭化リチウム水溶液に120℃で溶解し、そのセルロース溶液をあらかじめ120℃で温めておいた大過剰の食塩粒子が入った容器へ注いだ。その後、室温まで冷却して再生ゲル化させ、水洗によって臭化リチウムと食塩粒子を除去することで均一かつ大孔径(100µm以上の孔径)のセルロースヒドロゲルを調製する手法を確立した。また、食塩粒子のサイズによってセルロースゲルの孔径や力学特性も制御できることが明らかになった。そして、このセルロースゲルを足場材料に用いてウサギ軟骨細胞を培養した。その結果、良好な軟骨細胞の増殖と軟骨への分化が確認でき、足場材料として適用出来る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Cellulose was completely dissolved in the 60 wt% lithium bromide aqueous solution in the temperature 120 degrees. Then the cellulose solution was poured into glass container containing large excess amount of salt (NaCl) particles that was heated at 120 degrees in advance. The cellulose was regenerated from the solution by cooling down to room temperature and removing the salts by washing with water. The cellulose gel thus obtained has a uniform and large pore size more than 0.1 mm in diameter. The particle size of salts used in the process leads to the control of morphology and mechanical properties of the gel. The gels were seeded with rabbit chondrocyte and cultured in vitro for three weeks, and proliferation of chondrocyte and its differentiation to cartilages were observed. In consequence, the cellulose gel has a possibility using as a three-dimensional scaffold for cell culture of tissue engineering.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

キーワード：セルロース ヒドロゲル 孔径制御 細胞培養 足場材料

### 1. 研究開始当初の背景

我が国は、高齢者人口がすでに 21%を超えた超高齢社会であるが、今後も高齢化率は上昇するといわれている。そのため、高齢者特有の骨粗鬆症や変形性関節症の罹患者も増大すると予想される。骨や軟骨組織は自己修復能が低いと、一旦これらの疾患に罹患してしまうと自然には治癒せず、またこれまで有効な治療方法もなかった。しかし、骨や軟骨組織を再生させる医療として、組織工学の手法が近年注目を集めている。これは、細胞をあらかじめ生体外で培養・組織化し、ついでこれを生体内に移植して組織を再現する技術である。骨や軟骨組織の再生技術(再生医療)として確立すべき課題は多いが、その中に生体外における細胞組織化のための三次元足場材料の開発がある。

### 2. 研究の目的

三次元足場材料に要求される基本的性質としては、1)移植のため生体適合性がある材料から作られていること、2)細胞成長のため 100  $\mu\text{m}$  以上の均質な孔のあいた多孔質であること、3)組織維持のため、多孔質ではあるもののある程度の力学特性を有すること、などが挙げられる。

セルロースは生体適合性があり、移植しても免疫拒否反応を引き起こさない材料である。また、これまでに三次元足場材料として開発されてきたコラーゲン、ヒアルロン酸、キトサン、シルクフィブロイン等に比べて、高強度・高弾性率であることが知られている。セルロースは生体移植後も分解されずに生体内にとどまるので、骨や軟骨組織において、高強度・高弾性率の発現に寄与するといえる。すなわち、直径 100  $\mu\text{m}$  以上の孔を有する多孔質材料をセルロースから調製できれば骨や軟骨細胞の三次元足場材料として適用できる。

そこで本研究では、天然高分子材料であるセルロースから有機溶剤等を一切使用しないグリーンケミストリーによって均一大孔径を有するヒドロゲルを調製し、組織工学の三次元足場材料としての適用の可否を評価した。

### 3. 研究の方法

#### (1)多孔質セルロースヒドロゲルの調製

ふるいを使用して食塩粒子を3段階のサイズに分級した(SA1, SA2, SA3)。そして、分級食塩 140 g を円柱状のガラス容器に入れ、120 のオイルバスで温めた。一方、無灰パルプ(ADVANTEC)1 g を 60% 臭化リチウム水溶液 99 g に懸濁させた。そして、この懸濁液を 120 のオイルバス中にて 20 分間攪拌し、セルロースを溶解させた。溶解後は、直ちに、あらかじめ 120 に温めておいた分級食塩入りガラス容器に流し込み、食塩粒子がセルロース溶液に均一に分散するように激しく攪拌した。そこに、短い筒状(直径 6 mm, 10mm、

高さ 1 cm)のガラスの型を押し込み、型の内部全体に食塩粒子分散セルロース溶液が充填されるようにした。その後、室温まで冷却し、一昼夜放置してセルロース溶液をゲル化させた。ゲル化後は、ガラスの型から取り出し、一晩水洗することで食塩と臭化リチウムを洗い流して多孔質セルロースヒドロゲルを調製した。

#### (2)セルロースゲルの構造・物性評価

##### 光学顕微鏡観察

調製したセルロースヒドロゲルをキシレン経路でパラフィンへ溶媒置換した。そして、パラフィンで包埋した試料から厚さ 20  $\mu\text{m}$  の切片を作製した。脱パラフィン後、1% アストラブルーにより染色し、光学顕微鏡で観察した。観察により得られた画像をもとに、それぞれのゲルについて孔径を測定した。

##### 走査型電子顕微鏡観察

セルロースヒドロゲルをエタノールシリーズで脱水させた。t-ブチルアルコールに置換後、凍結切断して直ちに凍結乾燥した。切断面をオスミウムコーティングし、走査型電子顕微鏡観察(S4800, 日立)を行った。なお、加速電圧は 1.0 kV とした。

##### 分子量測定

セルロースヒドロゲルは 105 で一晩乾燥後、8% 塩化リチウム(LiCl)/ジメチルアセトアミド(DMAc)へ溶解させた。その後、1% LiCl となるように DMAc で希釈して、ゲル濾過クロマトグラフィーによる分子量測定に供した。

##### X線回折

セルロースヒドロゲルの凍結乾燥物を試料とした。X線源としてニッケルフィルターで単色化した CuK  $\alpha$  線(波長 0.1542 nm)を用いた透過型 X 線回折測定(Rotaflex, Rigaku)に供した。

##### 含水率

セルロースヒドロゲル表面の余分な水分をキムワイプで除去した後、重量を測定した。その後、105 の乾燥器で一晩乾燥させた試料の重量との差から含水率をウェットベースで算出した。

##### 圧縮試験

セルロースヒドロゲル(直径 10 mm、高さ 1 cm)を試料として用い、水中に浸した状態で圧縮試験(EZtest, Shimadzu)を行った。なお、ロードセルは 10 N を使用し、クロスヘッドスピードは 1.0 mm/min とした。

#### (3)セルロースヒドロゲルのキトサンによる表面修飾

セルロースヒドロゲル(直径 6 mm、高さ 1 cm)を過ヨウ素ナトリウム水溶液中にて遮光下、室温にて 24 時間酸化処理し、水洗した。これらのゲルを 2.5 wt% キトサンの 2 wt% 酢酸水溶液に一昼夜、室温にて浸漬してキトサングラフト重合反応を行った。その後、水素化ホウ素化ナトリウムで還元し、十分に水洗

した。これらのセルロースヒドロゲルはオートクレーブで滅菌（115、10分）した。

#### (4) 細胞培養

ウサギ由来軟骨細胞培養キット（コスモバイオ）を使用してセルロースヒドロゲルの細胞足場材料としての適用の可否を評価した。

過ヨウ素酸酸化後キトサングラフト重合させたセルロースヒドロゲルと酸化ならびにキトサングラフト重合処理を行っていないセルロースヒドロゲルを増殖用メディウムに浸漬しゲル内部の水を培地へと十分に置換後、ヒドロゲルへ細胞をしみ込ませるように細胞を播種した。培養は24穴プレートを使用して行った。細胞播種後一日おきに培地を交換しながら4日間の細胞増殖を経た後、培地を分化用メディウムに交換した。分化誘導中は、4日おきに培地交換を行いながら3週間の分化誘導を行った。分化誘導後、各セルロースゲルを3%の中性ホルマリンに浸漬して細胞および軟骨組織を固定した。常法に従い、エタノール脱水とパラフィン包埋後、スライディングミクロトームを使用して10 $\mu$ m厚の切片を作製した。脱パラフィン後の切片をアルシアンブルー（1% Alcian Blue in 3% acetic acid, pH 2.5）により軟骨の主要成分であるコンドロイチン類を染色、細胞の分布を観察するために細胞核をケルンエトヒロート液（0.1% Nuclear fast red-aluminum sulfate solution in water）で染色した。染色切片は光学顕微鏡で観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 多孔質セルロースゲルの調製と構造

3段階のサイズに食塩粒子を分級した（SA1, SA2, SA3）。図1にその光学顕微鏡写真（SA2）を示す。分級後の食塩した食塩粒子形状は、いずれも立方体であった。また、平均粒子径を表1に示す。

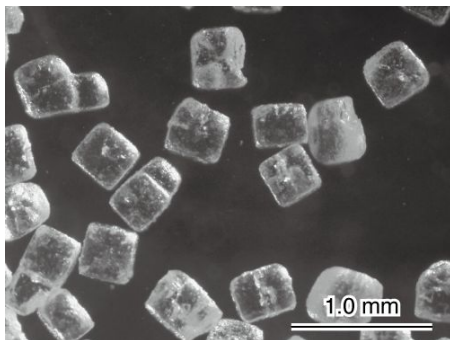


図1 分級食塩粒子（SA2）の光学顕微鏡写真

食塩を使用せずにセルロースゲルを調製した場合は孔構造が観察されず、密実であった。一方、食塩粒子を使用してセルロースヒドロゲルを調製したところ、分級した食塩粒子サイズに対応した孔径を有するゲル（CG1, CG2, CG3）が調製できた（図2、3）。

表1 分級食塩粒子の平均粒子径

分級食塩	平均粒子径
SA1	320 $\mu$ m
SA2	390 $\mu$ m
SA3	530 $\mu$ m

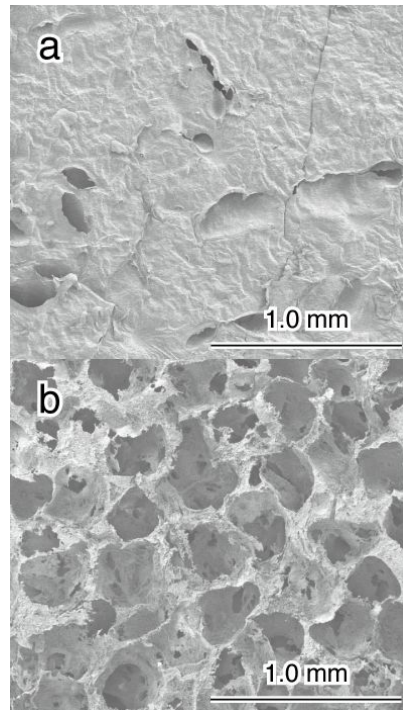


図2 セルロースゲル内部断面の走査型電子顕微鏡像。a: 食塩なし（対照） b: 分級した食塩 SA2 を使用したセルロースゲル（CG2）。

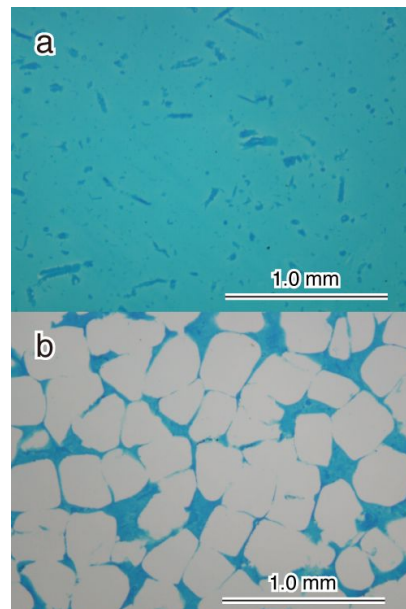


図3 セルロースゲル切片の光学顕微鏡像。a: 食塩なし（対照） b: 分級した食塩 SA2 を使用したセルロースゲル（CG2）。

図3に示した光学顕微鏡像より、各ゲルの平均孔径を算出したところ、表2のようになった。使用した食塩粒子サイズよりも若干小

さいが、粒子サイズが大きいほどセルロースゲルの孔径も大きかった。すなわち、細胞培養に不可欠である 100  $\mu\text{m}$  以上の大孔径を有するセルロースゲルを調製する手法を確立することができ、その孔径制御が可能であることが明らかとなった。

細胞培養時においては、細胞の三次元的な成長と物質の輸送のために十分な大きさの孔と孔をつなぐ連結孔が存在していることが重要である。食塩を使用してセルロースゲルを調製した場合は、大きさにばらつきはあるものの (30~300  $\mu\text{m}$ ) この連結孔が頻度よく観察された (図 2 b、3 b)。

表 2 セルロースゲルの孔径

セルロースゲル	孔径	使用食塩
CG1	290 $\mu\text{m}$	SA1
CG2	340 $\mu\text{m}$	SA2
CG3	470 $\mu\text{m}$	SA3

### (2) 多孔質セルロースゲルの構造・物性

調製したセルロースゲルの重合度はいずれも 1,000 程度であった。元の無灰パルプの重合度 1,100 よりも若干低下していたが溶解・再生過程においてほとんど重合度低下が起きていないことが明らかとなった。また、X線回折測定の結果からセルロースゲルはいずれも低結晶性のセルロース II の構造であることが分かった。

セルロースヒドロゲルの含水率と圧縮弾性率を表 3 に示す。食塩を使用せずにゲルを調製した場合 (CG0) は含水率が低く、圧縮弾性率が大きかった。一方、食塩を使用した場合 (CG1, CG2, CG3) は、含水率は 98% を超えており、高い保水力があることが分かった。また、圧縮弾性率は孔構造が存在していることとセルロース含量が少ないことによって食塩を使用しなかった場合 (CG0) の 1/20 以下であった。しかし、圧縮弾性率 0.45~0.75 MPa の値は、細胞足場材料として使用されているヒアルロン酸、コラーゲンなどより十分高かった。すなわち、このセルロースヒドロゲルは細胞培養に十分な強度を有していることが明らかとなった。

表 3 セルロースヒドロゲルの含水率と圧縮弾性率

セルロースゲル	含水率	圧縮ヤング率
CG0 (食塩なし)	94.2 %	12.5 MPa
CG1	98.8 %	0.52 MPa
CG2	98.9 %	0.75 MPa
CG3	98.6 %	0.45 MPa

### (3) 細胞培養

セルロースヒドロゲルとそのキトサングラフトセルロースヒドロゲルを足場材料に用いてウサギ軟骨細胞を培養した。4 日間の増殖培養の後、21 日間の分化培養を行った。そして、切片を作製後、ゲル内部の光学顕微鏡観察を行った結果、キトサングラフトセル

ロースヒドロゲルでは良好な細胞増殖と分化は確認出来なかった。しかし、セルロースヒドロゲルでは良好な軟骨細胞の増殖と軟骨への分化が確認できた (図 4)。このセルロースヒドロゲルは細胞培養のための足場材料として適用出来る可能性が示唆されたといえる。

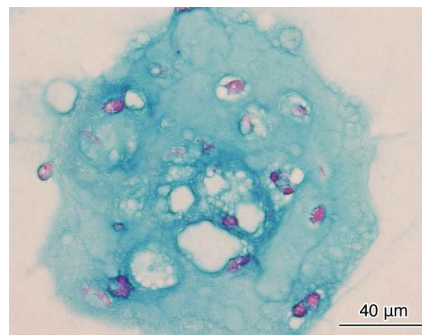


図 4 ウサギ軟骨細胞を培養したセルロースヒドロゲル切片の光学顕微鏡写真

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Y.J. Yang, J.M. Shin, T.H. Kang, S. Kimura, M. Wada, U.J. Kim, Cellulose dissolution in aqueous lithium bromide solutions, Cellulose, 21(3), 1175-1181 (2014)  
DOI: 10.1007/s10570-014-0183-9

### 〔学会発表〕(計 1 件)

駒宮健大、磯部紀之、木村 聡、和田昌久、金 雄鎮、セルロースを基材とした細胞足場材料の調製、セルロース学会第 20 回年次大会、2013 年 7 月 18 日、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザ (京都府)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

和田 昌久 (WADA, Masahisa)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・准教授  
研究者番号: 40270897

### (2) 連携研究者

木村 聡 (KIMURA, Satoshi)  
東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教  
研究者番号: 00420224