

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25630312

研究課題名(和文)3D細胞電気刺激培養のための導電性多孔質セラミクス電極の開発

研究課題名(英文)Development of electrical conductive porous ceramics electrode for 3D-electric stimulus cultivation

研究代表者

吉田 英弘 (Hidehiro, Yoshida)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・先端材料プロセスユニット・主幹研究員

研究者番号：80313021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、3D細胞電気刺激培養を目標として、電気伝導性、透光性、耐熱性・耐薬品性を併せ持ち、細胞の培養空間および培地の流路を備えた酸化物半導体多孔質マトリックスを開発すると共に、それを用いた細胞電気刺激培養の可能性を検証した。室温でも十分な電気伝導率を有する酸化物緻密体を数種類得ることに成功し、これを薄膜化することで透光性も確保できることを確認した。この製造には、従来の焼結法に加えて電場印加を利用した通電加圧焼結法も採用した。また、細胞サイズに適合する数百ミクロンの孔を多数有する多孔質体の作製にも成功した。これを利用することで、細胞の培養、電気刺激、化学物質の分泌誘導に成功した。

研究成果の概要(英文)：The present study aims to develop new electrical conductive, porous ceramic electrodes for 3D-electric stimulus cultivation. For this purpose, the porous ceramics should exhibit electrical conductivity at room temperature, translucency, heat resistance and chemical stability, together with the voids with the diameter of a few micron meter. In this study, electric stimulus cultivation was also examined by using the ceramic electrodes. We have demonstrated that several kinds of conductive, porous oxide electrodes can be produced by employing electric current assisted sintering technique, and confirmed the translucency and chemical stability. In addition, electric stimulus cultivation was possible on the ceramic electrodes, and induction of chemical substance excreted from cells was enhanced by the electric stimulus.

研究分野：セラミック材料学

キーワード：生体材料 セラミックス 生物・生体工学 微細組織 細胞電気刺激培養

1. 研究開始当初の背景

生細胞を電極上で培養し微小電位を印加することで、細胞機能を通常の状態から変化させる、いわゆる細胞電気刺激培養が注目されている。特に電気刺激により遺伝子発現 (S. Koyama et al., Nature Biotechnology, 15 (1997) 164) や細胞の分化 (Y. Kawahara et al., Pathobiology, 73 (2006) 288) などをコントロールすることが可能であることが報告されており、将来の再生医療や人工臓器開発、リハビリテーション分野などへの応用が期待されている。

従来、多くの細胞電気刺激培養では、ITO 蒸着ガラス電極の上で細胞を平面的に培養し白金対極 (Pt) との間に電位を印加する手法がとられてきた (N. Tandon et al., Lab on a Chip, 10 (2010) 692)。この手法により多くの基礎研究がなされたが、平面培養で扱える細胞数の限界や、インジウム (In) 等の電極材料が細胞に及ぼす影響などの問題があり、特に細胞の立体的高密度化、すなわち細胞培養基板の 3D 化の必要性が指摘されてきた。3D 細胞培養基板としては、コラーゲンスポンジに代表されるような生体親和性の高い生体模倣型細胞培養材料が開発されている (H. Lu et al., Biomaaterials, 31 (2010) 5825) が、基本的にはタンパク質と乳酸などのポリマーであるため導電性を示さない、滅菌処理が困難といった問題があった。

3D 細胞電気刺激培養における細胞培養基板には、理想的には(1)電気刺激のための電気伝導性、(2)その場観察を可能とする透光性、(3)滅菌を行うための耐熱性 (100 °C ~ 200 °C)・耐薬品性を併せ持ち、(4)細胞の培養空間としての空隙 (十~数十 μm) および培地 (栄養分) の流路を多層的・立体的に内包した多孔質マトリックスが求められる。

2. 研究の目的

本研究では、電気伝導性・透光性・耐熱性を併せ持つ酸化物半導体セラミクスに着目し、3D 細胞電気刺激培養を目標として、(1)細胞への電気刺激のための電気伝導性、(2)その場観察を可能とする透光性、および(3)滅菌を行うための耐熱性 (100 ~ 200 °C)・耐薬品性を併せ持ち、(4)細胞の培養空間および培地 (栄養分) の流路を備えた酸化物半導体多孔質マトリックスを開発すると共に、それを用いた細胞電気刺激培養の可能性を検証した。

本研究課題は機能・構造材料およびバイオプロセスに亘る分野融合型の挑戦的テーマである。すなわち、バイオプロセス分野で開発されてきた細胞電気刺激培養技術に対して、研究代表者が培ってきたセラミクス材料の微構造制御技術を適用することで、新しい 3D 細胞機能コントロールプラットフォームを提供することを目指している。

本研究の斬新なアイデアは、(1)電気伝導性、(2)透光性、(3)耐熱・耐薬品性を併せ持

つ酸化物半導体を(4)立体的・多層的多孔体マトリックスとし、3D 細胞培養基板を開発するという点にある。こうした特性を併せ持つ多孔質マトリックスが創製できれば、図 1 の様に培地や細胞分泌物が循環する生体に近い環境で細胞を培養し、細胞に対して立体的に電気刺激を印加してその反応を in-situ 観察することが出来る。

これは従来のバイオプロセス分野には無い、分野融合によって初めてもたらされた発想であり、機能・構造材料およびバイオプロセスのいずれの分野にとってもチャレンジングな課題である。研究代表者と研究分担者は、それぞれ機能・構造材料分野およびバイオプロセス分野という異分野で実績を挙げているが、互いの最新成果と情報を交換し研究討議を重ねることで、今回の学際的な研究課題を提案するに到った。こうしたアプローチは国際的にも未だ着手されておらず、学術的にも極めてユニークであると同時に、下記の如く将来の応用展開も大きく期待できるテーマである。本研究で目指す 3D 細胞電気刺激培養やそれらの in-situ 実験が可能となれば、細胞電気刺激培養の実用展開が飛躍的に推進され、将来の再生医療や人工臓器開発、リハビリテーション分野、さらには細胞デバイス開発などへの応用が期待される。

従来の平面培養では、扱える細胞の数や密度、細胞間の相互作用、細胞から分泌される物質量が限られてしまうことから、実際の生体環境とはかけ離れた点が多く、実用展開は困難とされてきた。これに対し 3D 細胞電気刺激培養基板を用いれば、単位体積当たりの細胞数が飛躍的に向上すると共に、より生体環境に近い立体的な細胞組織作製・制御の可能性が開かれ、生物学・医用工学分野への展開がより現実的になる。また、本研究を通して新しい細胞機能コントロールプラットフォームを提供することができれば、例えばコンピュータと生細胞とを繋ぎ電気信号により情報伝達・機能制御を可能とするデバイス、すなわち機械-有機生体コンポジットデバイスの開発など、来たるべき 3D 細胞デバイス時代の先鞭をつけるものと期待される。

3. 研究の方法

細胞の培養空間 (数百ミクロン) および培地の流路を確保することが肝要であり、またそれぞれの培養空間 (空隙) 同士を立体的に連結させることで、(1)細胞に対する立体的な電気刺激、(2)細胞間の化学的・物理的接触、および(3)培地の循環を可能にする。研究代表者が培ってきた微構造制御技術、とりわけ機能元素のドーピング技術と、通電加圧焼結をはじめとする外場制御焼結法を駆使して、半導体酸化物多結晶体からなる多孔質マトリックスを製造する。細胞電気刺激培養基板に求められる電気伝導性、透光性、耐熱・耐薬品

性を考慮し、ZnO および SnO をマトリックス材料として利用した。市販の高純度粉末を利用し、電気伝導率を向上させるための機能元素ドーピングを施すと共に、(通常は電気伝導率向上のための機能元素は焼結性を低減させるため)パルス通電加圧焼結を利用し、緻密体の製造方法を確立する。また、発泡剤添加法、可燃性樹脂ビーズ添加法、高分子ゲル化法を駆使して多孔質体の製造を行った。得られた多孔質マトリックスの微細組織形態および透光性の評価については、研究代表者が所属機関に現有の光学顕微鏡、SEM を用いて行った。

多孔質マトリックスの細胞毒性や、形成されたマトリックスの空隙サイズや形状に対する細胞接着性については研究分担者が評価した。なお、最近の研究では、ZnO はナノ粒子化することで細胞毒性が認められるとされるものの (H. Ma et al., Environmental Pollution, 172 (2013) 76) ZnO 上での細胞培養の例も報告され始めており (P.I. Reyes et al., Biosensors and Bioelectronics, available online (2012))、本研究で開発する多結晶であれば細胞毒性は特に無いものと考えられる。最終的には焼結によって得られた緻密体および多孔質体を機械研磨して多孔質マトリックスを得、実際に細胞電気刺激培養の可能性を検証した。

4. 研究成果

室温でも十分な電気伝導率を有する酸化物緻密体を数種類得ることに成功し、これを薄膜化することで透光性も確保できることを確認した。この製造には、従来の焼結法に加えて電場印加を利用した通電加圧焼結法も採用した。また、細胞サイズに適合する数百ミクロンの孔を多数有する多孔質体の作製にも成功した。

ZnO 基板については、機能元素として Al を微量ドーピングすることで、電気伝導率を向上させ、且つ室温でも電子伝導を発現する緻密体の製造に成功した。また、発泡剤添加によって、数百ミクロンの孔を多数有する多孔体の作製手法も確立した。図 1 に、得られた多孔体の光学顕微鏡写真の一例を示す。平均気孔径は約 240 ミクロン、気孔率は 60% である。透明感のある多孔体であり、且つ室温で電気伝導を示していた。

一方、SnO₂ は電気伝導酸化物として極めて有望であるも、その焼結性は極めて低く、通常の焼結ではバルク体を製造することは不可能である。これに対して本研究では、電場印加を利用したパルス通電加圧焼結法を適用し、緻密体ならびに微構造を制御した多孔体の製造に成功した。また、機能元素の添加により、無添加材と比べて最大で約 300 倍の電気伝導率を有する SnO₂ 基板の製造に成功した。当然ながら室温でも十分な電気伝導率を持つ材料であり、耐熱性や化学的安定性、特に生体毒性が極めて低いことから 3D 細胞電

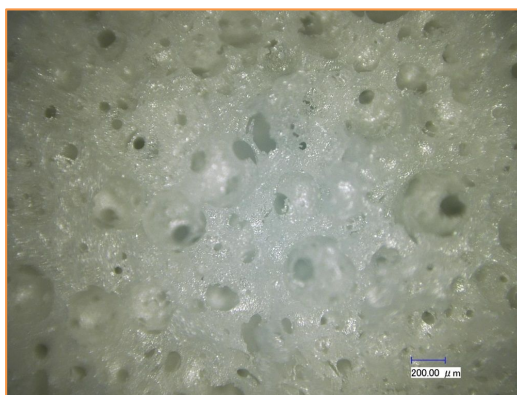


図 1 得られた ZnO マトリックス多孔体の光学顕微鏡写真。平均孔径 240 ミクロン、気孔率は 60% であった。

気刺激培養基板として有望な材料である。本性にかんしては現在論文投稿準備中である。また、この材料については、可燃性樹脂ビーズ添加によって効率的に多孔体を製造することが可能であった。この手法により、孔径や空隙率を高度にコントロールすることができる。図 2 に、SnO₂ 多孔体の光学顕微鏡写真を示す。孔径 100~200 ミクロン、気孔率約 65% の多孔体を得られた。

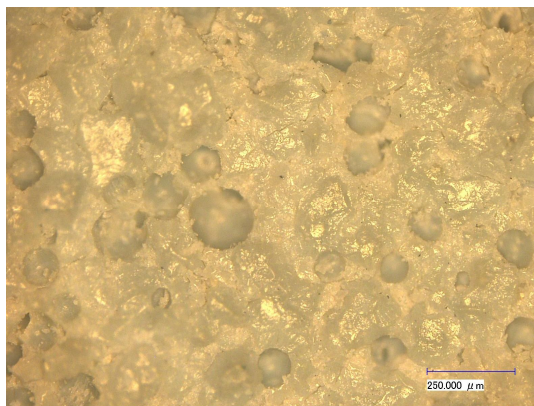


図 2 SnO₂ マトリックス多孔体の光学顕微鏡写真。

最終的に、共同研究者により細胞培養及び電気刺激実験を実施した。本実験では、最初のステップとして平面基板を用い、基板を殺菌、細胞培養槽を作製し、これに細胞を播種し電気刺激を加え、細胞生成化学物質の濃度を測定した(図 3)。その結果、電気刺激後もセラミック基板上で細胞の活動が確認された。また、ガラス基板上の刺激無しの細胞と比べて、短時間の電気刺激により細胞生成化学物質の分泌が促進されていることを示唆するデータを得た。さらに、ITO 基板を用いた実験と比較しても、電気刺激がより有効に働いている様子が観察された。

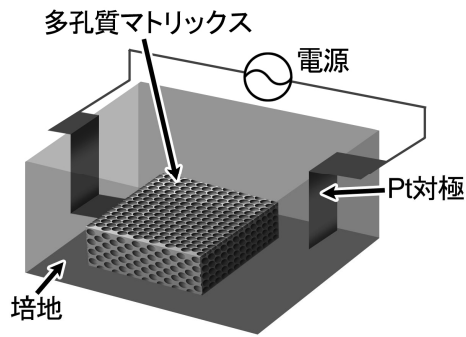


図3 細胞電気刺激培養検証実験の模式図

以上の結果から、当初の目的であった、3D電気刺激細胞培養の基礎研究に資するための電極基板の作製に目途が立ったと言える。今後、これを利用したデバイスを開発し、新たな医療・バイオ技術(図4)として発展させるためには、さらに基礎データを積み重ね、当該目的に適した電気伝導率や構造の探索、細胞への刺激の最適化、また細胞の観察・分析手段を確立すると共に、3D電気刺激細胞培養の基礎研究を進めるべきであると考えられる。

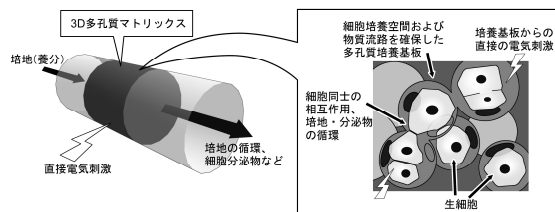


図4 3D細胞電気刺激培養多孔質マトリックスのイメージ

5. 主な発表論文等 (なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 英弘 (YOSHIDA, Hidehiro)
物質・材料研究機構 先端材料プロセスユニット・主幹研究員
研究者番号：80313021

(2) 研究分担者

舟橋 久景 (FUNABASHI, Hisakage)
広島大学 サステナブル・ディベロップメント実践研究センター・特任講師
研究者番号：60552429