

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：34416

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630355

研究課題名(和文)光化学反応を利用した細胞培養器の開発

研究課題名(英文)Development of photo-responsive cell culture vessels using photochemical reactions

研究代表者

上田 正人(Ueda, Masato)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号：40362660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：(a) Ti, (b) SiO<sub>2</sub>基板上にTiO<sub>2</sub>を成膜した培養器を作製した。培養器(a)に骨芽細胞を播種し、紫外光(UV)の連続照射と断続照射を行った。連続照射では細胞数が減少した。TiO<sub>2</sub>では、上方からの直接照射によるダメージに加え、基板の光化学反応による効果が重畳した。一方、断続照射では細胞数は増加した。UV照射による水酸基密度の上昇によると推察した。培養器(b)では光を照射するとTiO<sub>2</sub>でUVが完全に吸収された。培養器に接着した細胞は、UV照射によって剥離した。TiO<sub>2</sub>の光化学反応を利用することで、細胞の接着を促進・抑制したり、接着している細胞を剥離したりできる可能性が実験的に示された。

研究成果の概要(英文)：Anatase-type TiO<sub>2</sub> is an n-type semiconductor which displays a high photocatalytic activity under ultraviolet (UV) irradiation. The purpose of this work was to develop photo-responsive cell culture vessels using the TiO<sub>2</sub> film and to investigate the adhesion/proliferation behaviour of cells on them. Two types of vessels with following structures were prepared; TiO<sub>2</sub> film on (a) pure Ti and (b) SiO<sub>2</sub> substrates. Osteoblasts were incubated for 4-72 h. During the incubation, the UV irradiation was applied continuously or intermittently for 1 h just after the seeding and every 24 hours from upper side. The cells drastically decreased under continuous UV irradiation. Cells were damaged by the direct UV. In addition, the effect of photochemical reaction from the TiO<sub>2</sub> might be superimposed on the cells. In contrast, the number of cells was increased by the intermittent irradiation. The cells could be detached from the vessel by the UV irradiation after adhesion.

研究分野：材料物性学

キーワード：生体材料 光化学反応 細胞

### 1. 研究開始当初の背景

近年、各種デバイス表面の生体機能を制御する研究が盛んに行われている。研究代表者もチタン製インプラント表面の骨伝導を促進・抑制するための表面修飾法について研究を行っている。具体的には、骨伝導を促進、抑制するとされる  $\text{TiO}_2$ 、 $\text{ZrO}_2$  をそれぞれ金属表面に合成している。その中で、表面の生体機能は合成プロセスによっても変化することが明らかとなった。このような生体反応は、特に毒性の強い物質を除き、物質そのものだけではなく、材料表面の電気的チャージ、官能基やその密度に強く支配されていると考えている。

光触媒や湿式太陽電池は半導体/水溶液界面でのバンドベンディング、光励起電荷の分離、表面の電気的チャージや官能基密度変化を巧妙に利用している。これらの現象は上述した生体機能を支配していると考えている因子と同じである。そこで、この光化学反応を生体材料における表面状態を制御するツール、さらには生体機能の切換トリガー(スイッチ)とし利用できないか考えた。そこで、研究代表者は、純チタン基板に合成した  $\text{TiO}_2$  膜に擬似体液中で紫外線(UV)照射を行った。UV照射の有無でリン酸カルシウムの析出形態が顕著に変化し、生体機能を制御できる可能性が示唆された[M. Ueda, T. Kinoshita, M. Ikeda and M. Ogawa, *Mater. Sci. Eng. C*, 29, 2009, 2246-2249]。

細胞の初期接着、増殖挙動もデバイス表面の電気的チャージや官能基の影響を強く受けると予想される。これらの因子を光照射によって非接触で制御できれば、細胞に関連する新たな生体機能の制御ツールとなり、新たな観点からの生体用デバイスの開発に繋がると考えた。

### 2. 研究の目的

光応答性を有する機能性セラミックス膜上に細胞を播種し、光照射を行うことで、細胞の振る舞いに及ぼす光化学反応の影響を調査することを目的とした。具体的には下記事項を検討した。

- (1) 純Ti基板、合成  $\text{SiO}_2$  基板上への光応答セラミックス膜の合成
- (2) 基板の光応答と細胞の接着・増殖挙動
- (3) 光応答セラミックスへの不純物ドーピング

### 3. 研究の方法

#### (1) 光応答セラミックス膜の合成

##### ① 純Ti基板への $\text{TiO}_2$ 膜の合成

純Ti板を  $80^\circ\text{C}$  に保持した  $5\text{ M H}_2\text{O}_2/0.1\text{ M HNO}_3$  混合水溶液に  $20\text{ min}$  浸漬することで化学処理を施した。引き続き、テフロン容器中で  $1\text{ M NH}_3$  水溶液に浸漬し、 $180^\circ\text{C}$ - $12\text{ h}$  の水熱処理を施した。さらに、大気中で  $400^\circ\text{C}$  - $30\text{ min}$  の熱処理を施した。

##### ② 合成 $\text{SiO}_2$ 基板への $\text{TiO}_2$ 膜の合成

合成  $\text{SiO}_2$  基板 ( $20 \times 20 \times 1\text{ mm}$ ) に  $\text{Ti}(\text{OC}_3\text{H}_7)_4$  を原料としたゾル・ゲル法により  $\text{TiO}_2$  膜を合成した。コーティング溶液の調製スキームは Fig.1 の通り。基板中心部にコーティング溶液を  $0.2\text{ mL}$  滴下し、 $1000 \sim 5000\text{ rpm}$  で  $30\text{ s}$  回転させるスピ

ンコーティングを行った。引き続き、大気中で  $5\text{ min}$  乾燥させ、 $400^\circ\text{C}$  - $30\text{ min}$  の熱処理を施した。

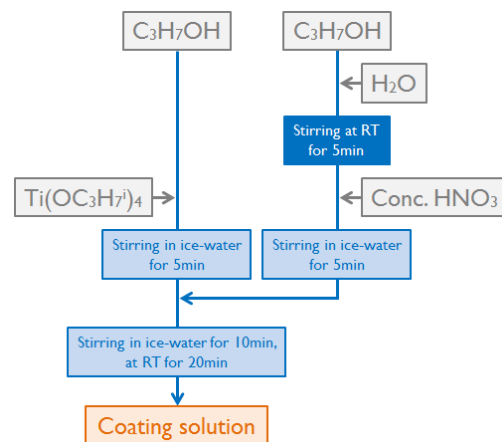


Fig.1 コーティング溶液の調製スキーム

### ③ 合成膜のキャラクタリゼーション

外観・表面観察は、汎用型デジタルカメラ、SPM (SPM-9600) で、合成物質の同定は、TF-XRD (RINT-2500, Incident ang.= $1^\circ$ ) で行った。酸化物膜の光応答性は、ブラックライト ( $\lambda=254\text{ nm}$ ,  $2020\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2$ ) とポテンシオスタット (HZ-5000) を使用し、リニアスweepボルタメトリーで光電流を測定すること、ならびに自然電位を測定することで評価した。Pt 対極, Ag/AgCl 参照電極, 電解液には Hanks 溶液を用いた。

### (2) 細胞の接着・増殖挙動

マウス由来初代骨芽細胞を各試料に播種し、 $37^\circ\text{C}$  で培養した。この培養中、ブラックライト ( $\lambda=365\text{ nm}$ ,  $2000\text{ mW}/\text{cm}^2$ )、または Xe ランプ ( $150\text{ W}$ ) を用いて、 $\text{TiO}_2/\text{Ti}$  では上方から、 $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$  では下方から光を照射した。

細胞数は、WST 法、ならびにギムザ染色を施した後、光学顕微鏡でカウントした。また、免疫染色を行い、接着斑数も評価した。細胞の大きさや周囲長等は ImageJ [Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997-2012] を利用して測定した。

### (3) 光応答セラミックスへの不純物ドーピング

$\text{TiO}_2$  膜を合成するためのコーティング溶液において添加した濃硝酸の代わりに、 $\text{NbCl}_5$  を溶解した濃塩酸を加え、コーティング溶液とした。コーティング方法、焼成方法は上述した通り。

### 4. 研究成果

#### (1) 光応答セラミックス膜の合成

##### ① 純Ti基板への $\text{TiO}_2$ 膜の合成

化学処理と水熱処理による表面修飾後の試料外観と SEM 像を Fig.2 に示す。試料は干渉色を呈し、非常に薄い膜が均一に合成されたことを示している。その膜は、一辺が約  $40\text{ nm}$  の立方体状の結晶で構成されていることがわかる。

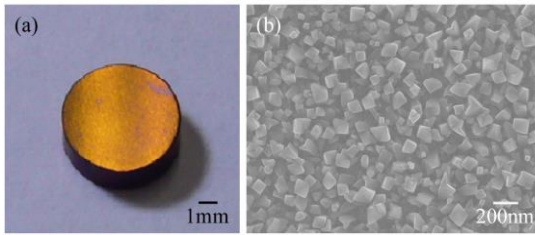


Fig.2 化学・水熱処理を施した純チタン試料の  
(a) 外観と(b) SEM 像

合成膜の XRD プロファイルを図.3 に示す。アナターゼ型  $\text{TiO}_2$  のシャープなピークが観察され、低温処理にもかかわらず、結晶性の高い  $\text{TiO}_2$  が合成されたことがわかる。また、この構造は  $400^\circ\text{C}$ -1h の熱処理後も維持された。

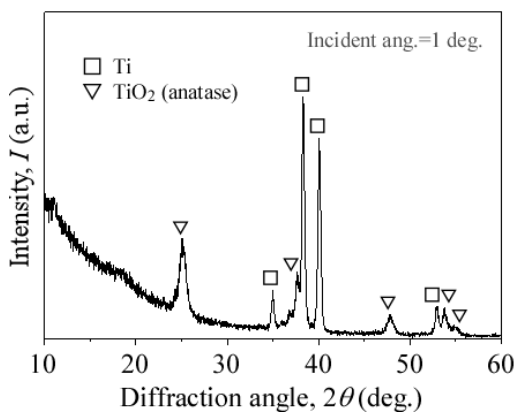


Fig.3 化学・水熱複合処理で純 Ti 表面に合成した酸化物膜の XRD プロファイル

リニアスイープボルタンメトリーによって試料の光応答性を調査した。UV を照射すると光電流が発生し、その応答は非常にシャープであることがわかった (Fig.4)。このように純 Ti 上に合成した  $\text{TiO}_2$  膜は、UV 照射に対して非常に敏感に反応するデバイスであると言える。

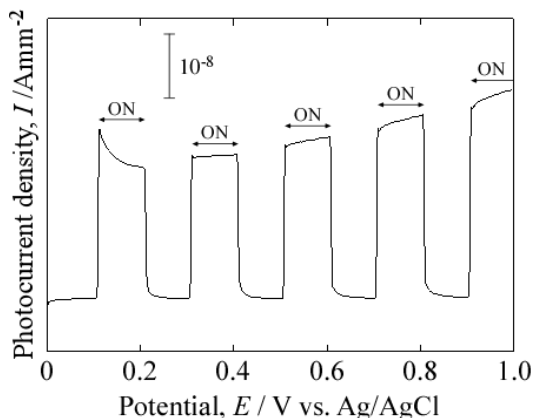


Fig.4 純 Ti 表面に合成した  $\text{TiO}_2$  膜で発生した光電流

## ② 合成 $\text{SiO}_2$ 基板への $\text{TiO}_2$ 膜の合成

回転数が 1000rpm, 2000rpm でスピニングを行うと、合成膜は無色透明ではなく、白濁した。回転数が 3000 rpm 以上になると無色透明となり、均一な膜が合成された (Fig.5)。また、膜厚は約 100 nm, 表面粗さは  $R_a=0.4$  nm であった。3000 rpm 以上では、回転数を増加させたとしても、その膜の表面形態、膜厚等に大きな変化が認められなかったため、以降、回転数は 3000 rpm とした。

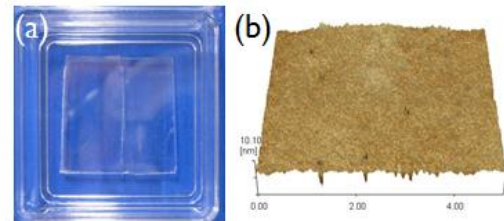


Fig.5 Sol-gel 法でガラス上に  $\text{TiO}_2$  を成膜した試料の(a) 外観と(b) SPM 像

$\text{SiO}_2$  基板と  $\text{SiO}_2$  基板上に  $\text{TiO}_2$  を成膜した試料の光透過スペクトルを図.6 に示す。 $\text{SiO}_2$  基板では、測定した全波長域の光がほぼ完全に透過した。それに対して、 $\text{TiO}_2$  を成膜した試料では、波長が約 380 nm 以上の光が透過した。すなわち、UV は  $\text{TiO}_2$  膜でほぼ完全に吸収されたことがわかる。

$\text{SiO}_2$  基板上に  $\text{TiO}_2$  を成膜し、 $\text{SiO}_2$  側から光を照射すると  $\text{TiO}_2$  膜表面に透過する光は可視光のみである。 $\text{TiO}_2$  表面で細胞を培養し、 $\text{SiO}_2$  側から UV を含む光を照射したとしても、細胞にはその UV が照射されない。

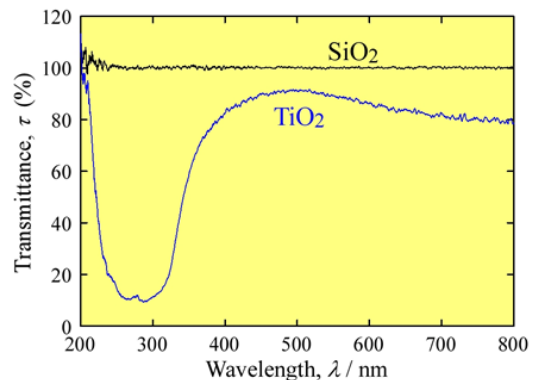


Fig.6 合成  $\text{SiO}_2$  基板上に合成した  $\text{TiO}_2$  膜における光透過スペクトル

リニアスイープボルタンメトリーによってガラス基板上に  $\text{TiO}_2$  を成膜した試料の光応答性を調査した。なお、この測定では、ガラス基板に透明電極である ITO を成膜した  $\text{SiO}_2$  板を用いた。純 Ti 上に合成した  $\text{TiO}_2$  膜 (Fig.4) と同様、UV を照射すると明瞭に光電流が発生し、その応答は非常にシャープであることがわかった (Fig.7)。このように  $\text{SiO}_2$  基板上に合成した  $\text{TiO}_2$  膜も、光照射に対して非常に敏感に反応するデバイスであると言える。

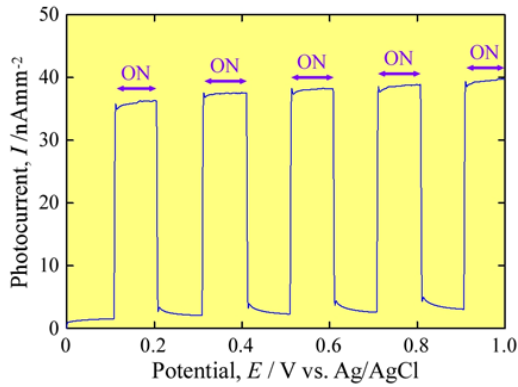


Fig.7 合成 SiO<sub>2</sub> 基板上に合成した TiO<sub>2</sub> 膜で発生した光電流

## (2) 細胞の接着・増殖挙動

### ① 純 Ti 基板上に合成した TiO<sub>2</sub> 膜における細胞の接着・増殖挙動(UV: 上方からの照射)

過去の研究で、純 Ti や化学・水熱複合処理で合成した TiO<sub>2</sub> 表面では、単調に細胞が増殖することがわかっている。

Fig.8は、(a) 連続照射、(b) 断続照射(播種後 1 h のみ照射) 下で 4 h 培養した細胞をギムザ染色し、光学顕微鏡を使用したカウントで求めた細胞密度である。なお、細胞密度は、暗所下の Ti における細胞密度で規格化した。UV の連続照射下では、純 Ti、TiO<sub>2</sub> で共に細胞密度は減少した(Fig.8(a))。これは、基板への細胞接着が抑制されたことを示している。UV は上方から照射したため、細胞にも直接照射された。これにより細胞はダメージを受け、基板への接着が暗所下に比べ抑制されたと推察している。一方、TiO<sub>2</sub> では、Student-t 検定によって、その減少が有意であることが示された。細胞への UV 直接照射の効果に加え、TiO<sub>2</sub> 表面で生じた光化学反応が重畳したと考えている。一方、UV の予備(断続)照射下では、純 Ti、TiO<sub>2</sub> で共に細胞密度は増加した(Fig.8(b))。TiO<sub>2</sub> に UV が照射されると、表面には光励起された正孔が集まり、正に帯電する。また、表面の水酸基密度が上昇することが知られている。これらの現象により、タンパク質の吸着が促進され、結果として細胞の接着も促進されたと推察している。純 Ti も表面は非常に薄い酸化物で覆われているため、TiO<sub>2</sub> と同様、細胞密度の上昇が観察されたと考えている。

断続照射下で 4 h、48 h、72 h 培養した細胞密度を Fig.9 に示す。これらは WST で求めた。PS は試料なしを意味する。この PS においては、短時間の UV 照射によっても、細胞密度はわずかに減少する傾向が認められ、いずれの培養時間でもその傾向は同じであった。これは、UV の直接照射が細胞にダメージを与えていることを意味する。それに対して、4 h 培養においては、UV の予備照射によって、Ti ならびに TiO<sub>2</sub> 上では、細胞密度が上昇した。これはギムザ染色後、光学顕微鏡でカウントした結果(Fig.8(b))と同様の傾向である。さらに、ここで TiO<sub>2</sub> における増加は有意であった。UV の直接照射が細胞に与えるダメージを上回るポジティブな効果が TiO<sub>2</sub> 上で

発生したことを示唆している。48 h、72 h 培養では、UV 断続照射においても、単調に増殖したが、UV 照射の方が暗所下に比べ、わずかに低い値を示した。培養時間に比べて UV の照射時間は短い、過剰照射は細胞の増殖抑制に繋がることを示している。UV 照射によって、細胞の増殖を促進させるには、最初の 1 h のみ照射する方法が効果的である可能性が高い。

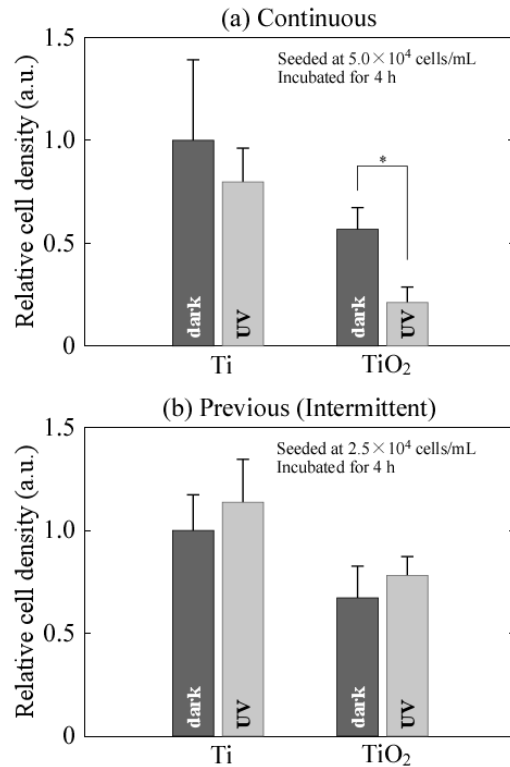


Fig.8 UV の(a) 連続照射、(b) 予備(断続)照射下で 4 h 培養された細胞数

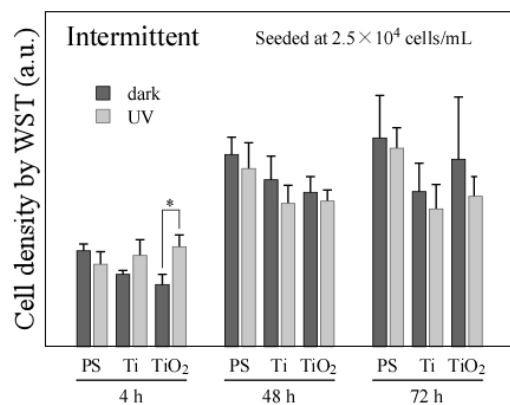


Fig.9 UV の断続照射下で培養された細胞数

暗所、UV の連続・断続照射下で 4 h 培養した細胞の免疫染色像を Fig.10 に示す。アクチン(細胞骨格を形成するタンパク質のうちのひとつ)、ビンキュリン(細胞接着に関するタンパク質)、核がそれぞれ緑、赤、青に染色されている。UV の連続照射では、細胞密度が減少するだけではなく、アポトーシスの前兆である細胞の収縮

も観察された。これらの像から、各細胞における接着斑数( $n$ )、周囲長( $d$ )、細胞サイズ( $D$ 、長手方向)を測定し、細胞サイズで規格化した隣接接着斑距離( $d(nD)^{-1}$ )を求めた(Fig.11)。TiO<sub>2</sub>において、UVの連続照射では隣接接着斑距離が暗所下のそれに比べて若干増加する傾向が認められた。これは、UV照射下のTiO<sub>2</sub>表面には、細胞が接着しにくいことを示していると考えている(Fig.11(a))。一方、断続照射では、暗所下、UV照射でほとんど変化が認められなかった(Fig.11(b))。

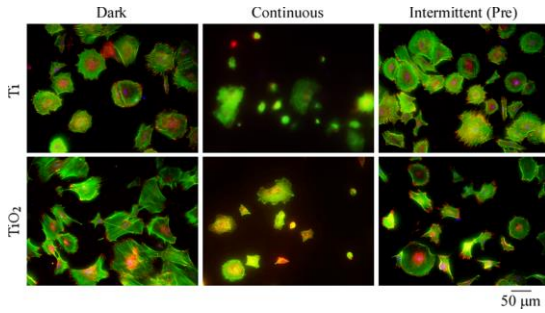


Fig.10 暗所、UVの連続・断続照射下で4 h 培養した細胞の免疫染色像

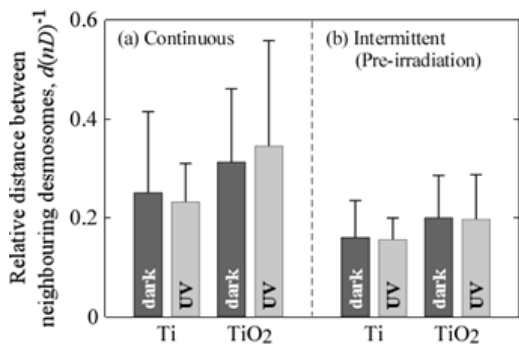


Fig.11 UVの連続・断続照射下で培養された細胞において細胞サイズで規格化した接着斑間距離

## ② 合成 SiO<sub>2</sub> 基板上へ合成した TiO<sub>2</sub> 膜における細胞の接着・増殖挙動 (UV: 下方からの照射)

SiO<sub>2</sub> 基板上に TiO<sub>2</sub> を成膜した細胞培養器に、細胞を TiO<sub>2</sub> 表面に播種し、SiO<sub>2</sub> 側から UV を連続的に照射しながら 4 h 培養した細胞のギムザ染色像を Fig.12 に示す。SiO<sub>2</sub> では、暗所下においても接着細胞数は非常に少なかったが、SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub> 共に UV の連続照射によって、接着細胞数は減少した。SiO<sub>2</sub> では、下方から照射した UV が吸収されることなく細胞に照射されるため、細胞はダメージを受け、接着細胞数が減少したと思われる。それに対し、TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> では、TiO<sub>2</sub> 膜で UV が吸収されるため、細胞へは可視光しか透過しない。それにもかかわらず細胞が接着していなかったため、この減少は TiO<sub>2</sub> の光化学反応によると言える。

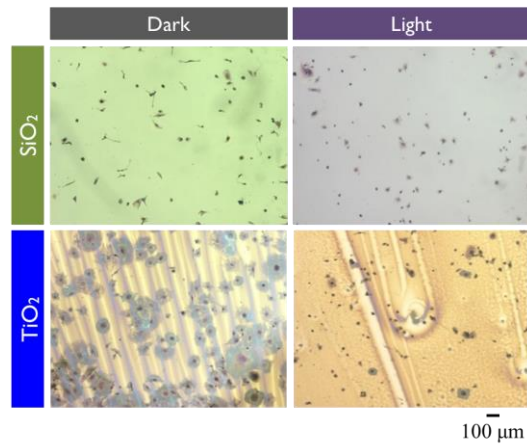


Fig.12 UVの連続照射下で TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> 表面に接着した細胞のギムザ染色像

Fig.12 に相当する免疫染色像を Fig.13 に示す。ここから単位周囲長あたりの接着斑数を求めた(Fig.14)。TiO<sub>2</sub> では UV を連続照射すると、単位周囲長あたりの接着斑数は減少した。この結果からも、UV 照射下の TiO<sub>2</sub> 表面は、細胞が基板に接着しにくい状態になっていると言える。

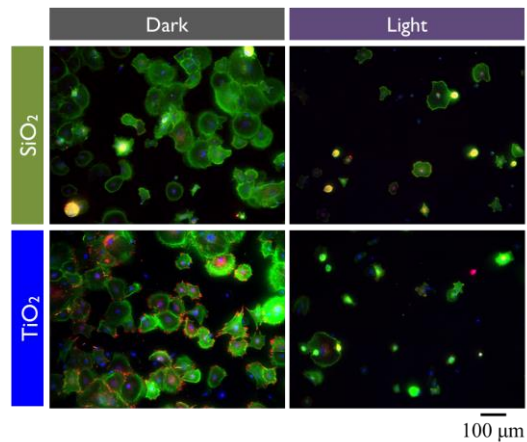


Fig.13 UVの連続照射下で TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> 表面に接着した細胞の免疫染色像

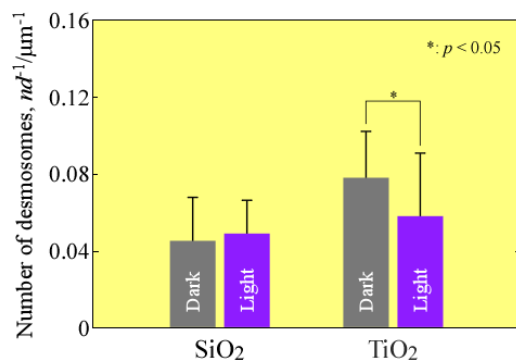


Fig.14 UVの連続照射下で TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> 表面に接着した細胞における単位長さ当たりの接着斑数

24 h 培養の終了 0.5 h 前, 2 h 前から UV を照射した際の細胞のギムザ染色像を Fig.15 に示す。これらから光学顕微鏡を利用して細胞密度を求めた (Fig.16)。SiO<sub>2</sub> では, 終了直前に UV を照射すると細胞数は減少した。また, UV 照射時間が長くなると, その減少量は大きくなった。これは, UV の直接照射により細胞がダメージを受けたことによると思われる。一方, TiO<sub>2</sub> でも UV 照射によって同様の細胞密度の減少が認められた。さらにこれらには有意な差があった。TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> の細胞培養器では, TiO<sub>2</sub> 層が UV を吸収してしまうため, 細胞に UV は照射されない。したがって, この細胞密度の減少は, TiO<sub>2</sub> の光化学反応によると言える。この細胞密度の減少は, 暗所下で増殖した細胞が剥離したことを示している。

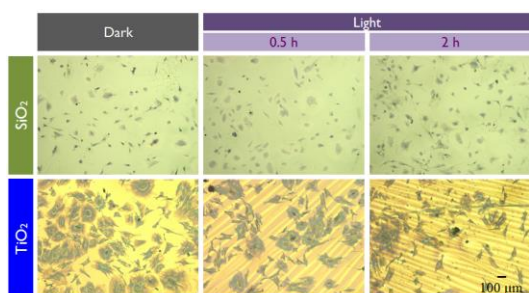


Fig.15 培養終了直前に UV 照射した TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> 表面における細胞のギムザ染色像

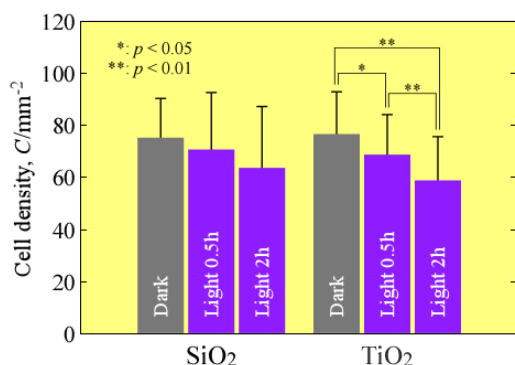


Fig.16 培養終了直前に UV 照射した TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> 表面における細胞数

### (3) TiO<sub>2</sub> への Nb ドーピング

TiO<sub>2</sub> と同様の手法で Nb を添加した TiO<sub>2</sub> 膜が合成できた。XRD プロファイルでは, TiO<sub>2</sub> ピークの低角シフトが観察されたので, Ti サイトを Nb で置換できていると判断した。光透過スペクトルにおいても, わずかであるが可視光吸収性が現れた。

### (4) まとめ

本研究では, 純 Ti 上に TiO<sub>2</sub> を成膜し, 上方から UV を照射する細胞培養器, SiO<sub>2</sub> 上に TiO<sub>2</sub> を成膜し, 下方から UV を照射する細胞培養器を作製し, 細胞の接着・増殖・剥離に及ぼす TiO<sub>2</sub> の光化学反応の影響を調査した。その結果, TiO<sub>2</sub> の光化学反応を利用した (i) 細胞の接着抑制, (ii) 細胞の接着促進, ならびに (iii) 接着し

た細胞の剥離が可能であることが示された。これらの原理の利用は, 細胞シートの作製や細胞の 3D プリンティング技術に応用できると考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 上田正人, 池田勝彦, 山本彩乃, 松垣あいら, 中野貴由, 背面照射型の TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> 光応答細胞培養器の試作, 日本金属学会, 東京理科大学(東京), 2016.3.25.
- ② C. Fujita, Y. Yoshida, M. Ueda, M. Ikeda, Synthesis of TiO<sub>2</sub> Film on Ti and Application to Photo-Responsive Cell Culture Vessels, International Symposium on EcoTopia Science, Nagoya University (Aichi), Japan, 2015.11.28.
- ③ 上田正人, 池田勝彦, 吉田和加, 藤田智香, 松垣あいら, 中野貴由, 酸化チタンの光化学反応を利用した細胞培養器の試作, 日本バイオマテリアル学会, 京都テルサ(京都), 2015.11.9.
- ④ 上田正人, 池田勝彦, 吉田和加, 松垣あいら, 中野貴由, 酸化チタン表面の細胞接着挙動における紫外線照射効果, 日本金属学会, 九州大学(福岡), 2015.9.18.
- ⑤ M. Ueda, Y. Yoshida, M. Ikeda, A. Matsugaki, T. Nakano, Adhesion/Proliferation of Cells on TiO<sub>2</sub> under UV Irradiation, 27th European Conference on Biomaterials, ICE Krakow (Krakow), Poland, 2015.8.31-2015.9.2.
- ⑥ M. Ueda, Y. Yoshida, M. Ikeda, Adhesion of Cells on Titanium Dioxide under UV Irradiation, The 13th Japan and Korea International Symposium on Recourses Recycling and Materials Science, Kyoto Garden Palace (Kyoto), Japan, 2015.5.14.
- ⑦ 上田正人, 池田勝彦, 湿式合成した TiO<sub>2</sub> 表面の HAp 形成に及ぼす熱処理と光照射の影響, 日本金属学会, 名古屋大学(愛知), 2014.9.25.
- ⑧ M. Ueda, M. Kato, M. Ikeda, Formation of Hydroxyapatite on TiO<sub>2</sub> and ZrO<sub>2</sub> in Simulated Body Fluid under UV Irradiation, The 12th Korea/Japan International Symposium on Resources Recycling and Materials Science, KIGAM (Daejeon), Korea, 2014.4.17-19.

[その他]

<http://www.chemmater.kansai-u.ac.jp/ecmate/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

上田 正人 (UEDA, Masato)

関西大学・化学生命工学部・准教授

研究者番号: 40362660