

補助事業番号 2023M-184

補助事業名 2022年度 酸化チタンマイクロチューブを用いた三次元細胞培養法の開発  
補助事業

補助事業者名 島根大学機能強化推進学系 教授 森本展行

## 1 研究の概要

本補助事業では、創薬開発を迅速かつ安価に行うための動物実験前段階における *in vitro* 評価法の構築に三次元細胞凝集塊とその課題に着目した。すなわち、三次元細胞凝集塊は生体類似の環境を構築し得るものの血管構造をもたないため、栄養分供給と代謝物排出ができず細胞死を引き起こす。そこで微小血管網を人工的なナノ構造から構築できれば、画期的な材料となると考えた。本事業では低細胞毒性であることが知られる酸化チタンから、壁面にナノポーラス構造をもつマイクロチューブとその膜の開発を、エマルションのエレクトロスピニングおよびカルシネーションという技術を導入して行った。エマルション形成のためのオイル選択、およびエレクトロスピニング条件において電圧・送液速度・溶液吐出シリンジ径を検討することで直径は340nm、空孔径はおよそ30nmの酸化チタンポーラスマイクロチューブ膜の調製に成功した。この膜はアナターゼ型の酸化チタンであることを確認するとともに、高い光触媒活性を示しヒドロキシラジカルを長時間にわたり生成することを示した。この膜上での細胞培養から、紫外線滅菌処理直後の播種では短期的にヒドロキシラジカルの残存と考えられる細胞毒性が発現したが、生存細胞は伸展し増殖できていたことが明らかとなった。今後、三次元細胞培養系の知見を得ることでデバイス開発へと繋げていく。

## 2 研究の目的と背景

がんをはじめとした創薬の現場において、膨大な開発費のため薬価が高額となり医療保険財政への影響に強い懸念が示されている。開発の初期段階である単層培養から動物実験への移行において試験結果の乖離は大きく、かつ動物実験には倫理的問題も伴う。これらの問題を解決に導く三次元細胞凝集塊による病態モデルが注目されるが、栄養分供給と代謝物排出機構の不備から常にサイズの制限を受ける。このため、不十分な細胞機能発現や短期間評価にとどまっており、三次元細胞凝集塊のポテンシャルを最大限発揮するために、三次元細胞凝集塊をセンチメートルスケールまで成長させ、細胞死を制御しつつも長期間培養・評価可能な三次元細胞凝集塊作製技術の開発が望まれる。本研究では三次元細胞凝集塊内部へ栄養分供給と代謝物排出を可能とする微小血管網の代替物を、ナノポーラス構造を壁面に有した酸化チタンマイクロチューブから作製して凝集塊に組み込むことでミリメートルサイズを超え、細胞死を抑えたまま生体内と類似した細胞機能発現において高い再現性を備えた三次元細胞凝集塊の作製法の開発を目的とする。

## 3 研究内容

酸化チタンマイクロチューブの作製

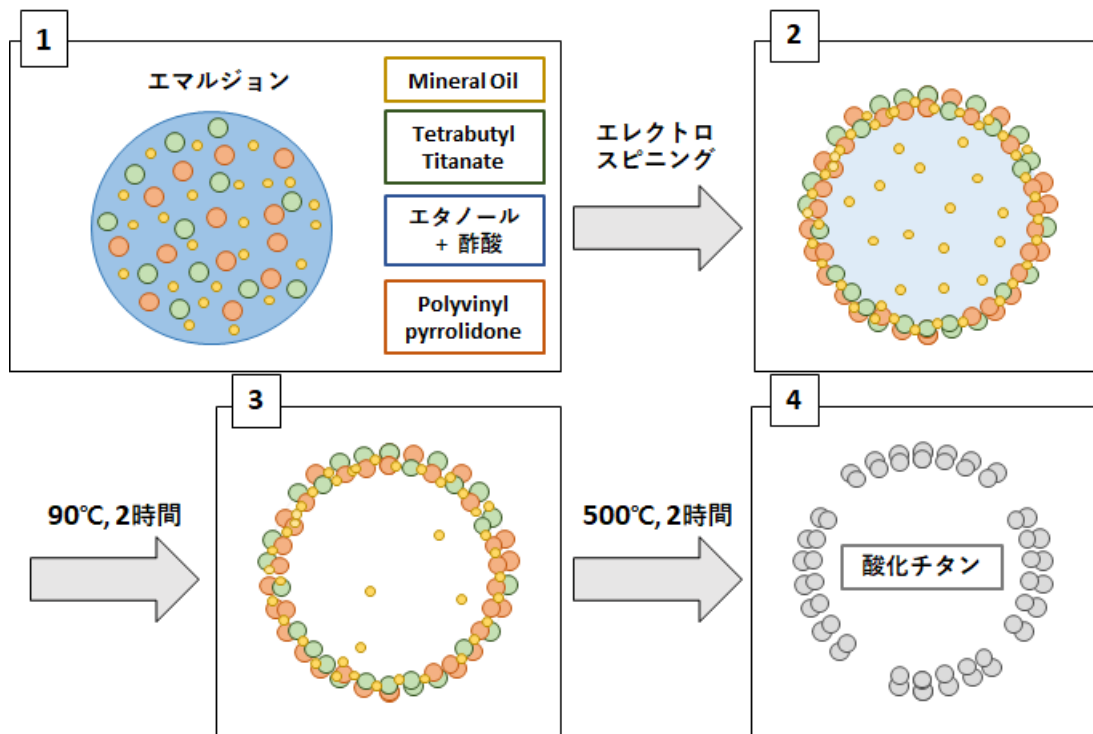


図 1 酸化チタンマイクロチューブ作製の最適化条件と機構

酸化チタンマイクロチューブの作製は、酸化チタンのプレカーソルとなるテトラブチルチタネート（TBT）をポリビニルピロリドンのエタノール／酢酸、オイルの混合溶液中に加えてエマルジョンを調製し、このエマルジョンをエレクトロスピンニング法によりナノファイバー薄膜を形成後に加熱処理とカルシネーション反応を行い、中空かつポラス構造を有した酸化チタンマイクロチューブの作製を試みた（図1）。

ここでは、カルシネーション反応条件を一定（500°C、2時間）とした上でエマルジョン調製におけるオイルの選択、およびエレクトロスピンニング条件のうち電圧・送液速度・針の直径について検討を行った。

エマルジョンはTBT0.60g、エタノール0.79g、酢酸1.05gからなる溶液と、ポリビニルピロリドン(Mw=360,000)0.2gを含む酢酸0.6g溶液を混合して1時間攪拌後、0.7gのオイル（オリーブオイル、ミネラルオイル、ヘキサン）を加え室温で48時間攪拌し、15分間超音波処理を行うことでエマルジョンを調製した。

前述の混合溶液を用いてエレクトロスピンニングを次の各条件において検討を行った (i) 電圧 (15kV、20kV、25kV)、(ii) 送液速度(1mL/h、2mL/h、4mL/h、8mL/h)、(iii) 溶液吐出シリンジ径 (18G、15G)。エレクトロスピンニングにおいて得られた薄膜を90°C、2時間の条件で残留溶媒をゆっくりと蒸発させた後、カルシネーション反応を行い、自然放冷後に

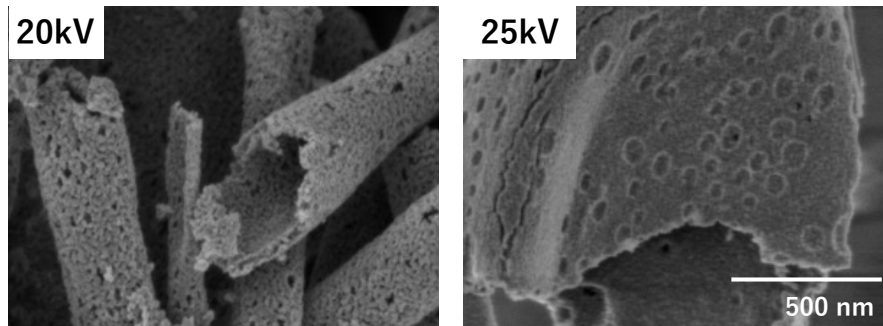


図 2 ミネラルオイルからなるエマルジョンから調製した酸化チタンマイクロチューブの SEM 像。(左：エレクトロスピンニング電圧 20kV、右: 25kV)

得られた膜を取り出して走査型電子顕微鏡観察を行い、得られた像を解析した。

エマルジョンの調製において、ミネラルオイルを用いた場合に最も分散性の高い溶液が得られた。いずれのオイルを用いた溶液でエレクトロスピンニングを行ってもポーラス構造をもったファイバーは形成されるものの、チューブ状構造を得ることができたのはミネラルオイル混合溶液からエレクトロスピンニングした薄膜のみであった。また溶媒組成に酢酸を加えずエタノールのみとした場合、チューブ構造はもとより空孔も得られなかったことから、安定エマルジョンの形成が必要であると確認された。エレクトロスピンニングおよび熱処理の機構から検討すると、エマルジョンはエレクトロスピンニングによりそのファイバー外膜がミネラルオイル、TBT、PVPであり内部に気化されなかったエタノールと酢酸を微量含有していると考えられる。このナノファイバー膜の90°C、2時間の熱処理から残存したエタノールと酢酸を気化させた。最後に、2°C/minの昇温速度で500°Cまで温度を上げて2時間熱処理を行った。このときミネラルオイルは気化、PVPは炭化し、TBTは熱分解することで酸化チタン多孔質マイクロチューブを形成した。次にエレクトロスピンニングにおける電圧条件を評価した。ここで、最も電圧の低かった15kVの場合、液滴がファイバー化せずにそのまま滴下した。これは液滴の帯電が表面張力と比べ弱かったためと考えられた。電圧条件が20kVと25kVでのマイクロチューブのSEM画像を図2に示す。これより、電圧が20kVと25kVのいずれの場合にもマイクロチューブが得られ、それらのチューブ径は190 nmでほぼ同程度であった。一方でチューブ側面の空孔の直径に影響を与えた。電圧が20kVと25kVへと高くなると空孔径20nmから40nmへと増加した。しかし、20kVの電圧ではポーラスであるのに対して25kVのときは空孔ではなく、クレーター状の凹みをもった構造となった。そのため、電圧は20kVが最適値であると結論づけられた。

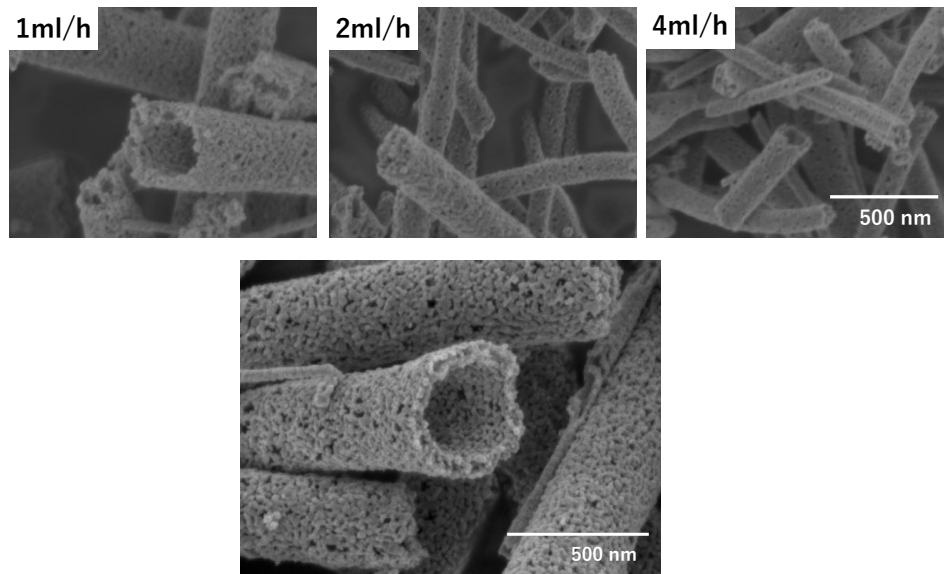


図 3 酸化チタンマイクロチューブの SEM 像。(上段) 送液速度が異なる場合に得られたマイクロチューブ像 (下段) 最適条件下で得られた酸化チタンポーラスマイクロチューブ

次にエレクトロスピンニング時における送液速度がカルシネーション後に得られるマイクロチューブ構造に与える影響について検討を行った。得られたマイクロチューブのSEM像を図3に示す。ここで送液が8mL/hの条件では速すぎるためかファイバーは得られずエマルション滴が落下した。SEM像よりいずれの場合も側面の多孔構造は確認されるものの、送液速度が速くなるほどファイバー径が細くなり、チューブ構造は認められにくくなることが明らかとなった。すなわち送液速度が最も遅い1mL/hの条件が最適であると判断された。また溶液吐出シリンジ径はサイズの大きい15Gを用いた場合にチューブ径が増大することを確認した。

これらの条件検討から最適条件は20kV、2mL/h、15Gであると考えられたため、この最適条件下で作製した酸化チタンマイクロチューブのSEM画像を図3に示す。作製した酸化チタンポーラスマイクロチューブの直径は340nm、空孔径は30nmと見積もられた。以降の実験はこのマイクロチューブを用いて評価を進めていく。

#### 酸化チタンマイクロチューブの物性評価

得られた酸化チタンマイクロチューブの検証をX線回折法(XRD)、メチレンブルー分解、2-ヒドロキシフタル酸の蛍光スペクトルの測定実験を行った。XRDの測定結果を図4に示す。これより、測定より得られた赤線の回折ピークは酸化チタンであること、なかでもアナターゼ型のピークとフィットすることが確認された。そのため次に酸化チタンの光触媒活性を確認するため、メチレンブルーの分解試験を行った。

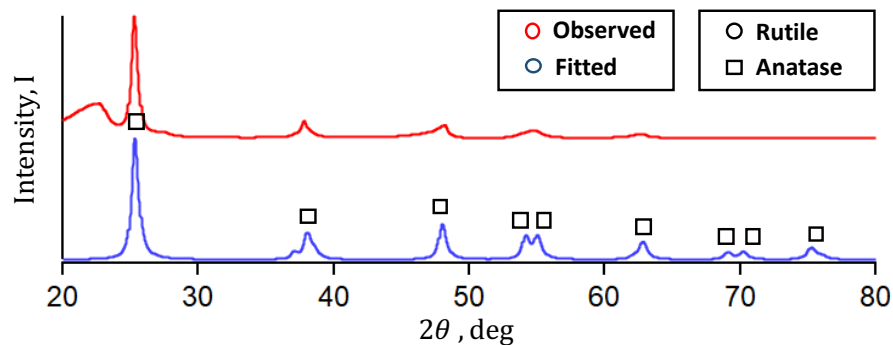


図 4 ミクロチューブ膜の XRD 測定

メチレンブルーを0.02mM、得られた酸化チタンマイクロチューブを1g/Lの濃度で混合、一晩攪拌した後、365nmの波長をもつ紫外線を1 mW/cm<sup>2</sup>で照射した。次に紫外線照射開始から0、1、2、3、4時間後に溶液1mLを採取し、その上澄み液を波長665nmの吸光度を測定した。メチレンブルーは還元により無色になるため、酸化チタンが光触媒活性を有していれば反応により吸光度は低下する。メチレンブルーの濃度と紫外線照射時間の関係は次の式で表される。

$$C = C_0 \exp(-k_{MB} t)$$

ここで  $C$  は測定時点のメチレンブルーの濃度、 $C_0$  はメチレンブルーの初期濃度、 $t$  は紫外線照射時間である。

紫外線照射時間によるメチレンブルーの濃度減少を図5に示す。青線は酸化チタンマイクロチューブ含有メチレンブルー溶液、赤線は非含有メチレンブルー溶液である。マイクロチューブを使用しなかったメチレンブルー溶液は紫外線照射によるメチレンブルーの濃度変化が認められなかった。一方で酸化チタンマイクロチューブを含有したメチレンブルー溶液は、

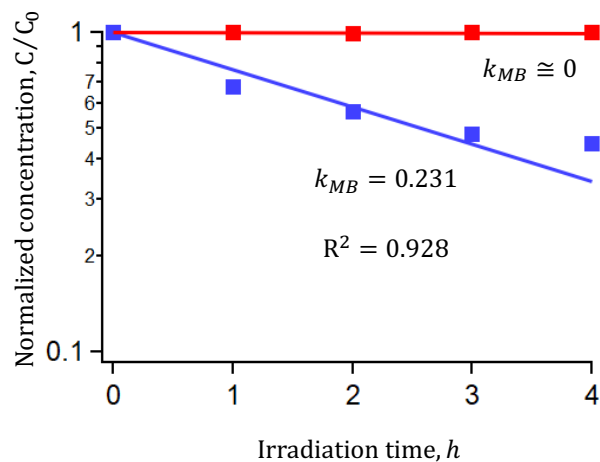


図 5 酸化チタンマイクロチューブ存在下での紫外線照射によるメチレンブルーの濃度変化

紫外線照射によりメチレンブルーの濃度が徐々に減少し、得られたプロットより  $k_{MB} = 0.231$ 、 $R_2 = 0.928$  と算出された。以上の結果より酸化チタンマイクロチューブは紫外線照射により光触媒反応を引き起こし、メチレンブルー濃度を減少させたと考えられた。

次にヒドロキシラジカルの検出を試みた。酸化チタンは光触媒反応を通じて活性酸素種であるヒドロキシラジカルやスーパーオキシドイオン、過酸化水素などを生成する。この中でヒドロキシラジカルはテレフタル酸と選択的に反応し、ヒドロキシフタル酸(HTA)を生成することが明らかとされている。このHTAは波長315nmの光を吸収し、425nmの光を放出する蛍光物質であるため、ヒドロキシラジカルの生成が検出可能である。そこで、テレフタル酸とマイクロチューブを混合して紫外線照射後の蛍光強度測定から酸化チタンの光触媒反応によるヒドロキシラジカル生成の検出を試みた。テレフタル酸を0.02mM、水酸化ナトリウムを0.05mM、得られたマイクロチューブを1g/Lの濃度でpH 7.4のリン酸緩衝液に混合した。その後、365nmの紫外光を1 mW/cm<sup>2</sup>で照射後、0、10、30、60分に溶液1mLを採取し、マイクロチューブを3000rpmで10分間遠心分離を行った。遠心分離後、上澄み液から200 $\mu$ L取り、96 ウェルプレートに入れて425nmで蛍光強度を測定した。図6に紫外線照射後における蛍光強度の時間変化を示す。紫外線照射時間が長くなるほど蛍光強度が増加した。これは、紫外線照射によりHTAが発生したこと、すなわちヒドロキシラジカルが発生したことが確認された。アナターゼ型の酸化チタンは光触媒反応よりヒドロキシラジカルを生成しやすいことから、マイクロチューブも同様に反応したと考えられた。ポーラス構造としたことで表面積が増加したため、蛍光強度が照射60分後においてもリニアな増加認められ、これは一方でテレフタル酸がマイクロチューブ内へ拡散した結果であると考えられた。SEM観察より見積もったマイクロチューブ径はおよそ340nm、空孔径も30nmであることから、タンパク質レベルのより大きい分子の場合でも内部へ十分に拡散できることを示唆していた。

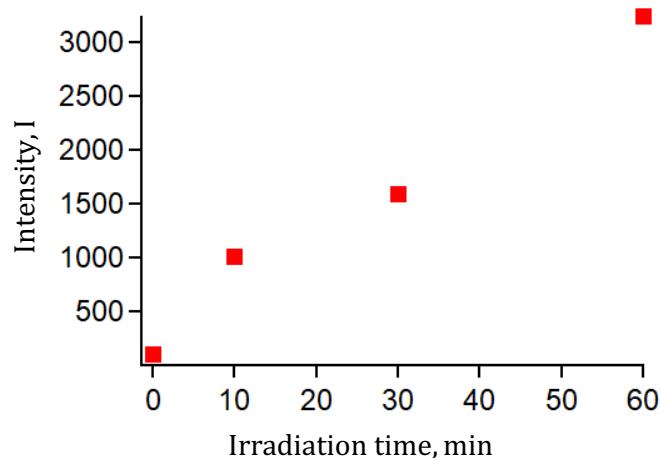


図 6 紫外線による HTA 蛍光強度時間変化

### 酸化チタンマイクロチューブ膜上における細胞の培養

得られた酸化チタンマイクロチューブは、当初マイクロメートルスケールで得られ、三次元細胞凝集塊内に混在させることを意図していた。しかし、結果としてバルクサイズの薄膜として得られた。エレクトロスピニングの特性からマイクロオーダーサイズの薄膜を調製すること、またバルクスケール薄膜での膜厚の精密制御は困難であることが明らかとなった。さらにカルシネーション前後の薄膜の粘性から鋭利な切断面でマイクロチューブ構造を保ったまま破碎、スケールダウンを行うことは容易ではなく、今後の研究に委ねざるを得なかった。しかしながら、得られた酸化チタンマイクロチューブは酸化チタンの特性を保持し、ナノポーラス構造に基づく優れた物質吸着・拡散特性とその展開が期待できるため、今後の細胞培養基材としての展望を得るため細胞培養を行った。酸化チタンマイクロチューブ膜を14mmφのサイズに切り抜き、24 ウェルプレート内にて紫外線滅菌した。その後、ヒト間葉系幹細胞を $2 \times 10^5$  cells/mLの濃度で培養した。1日目、5日目に細胞をLive/Dead染色を行い蛍光顕微鏡にて観察した。さらに培養7日目の酸化チタンマイクロチューブ上の細胞を固定化処理してSEM観察を行った。図6に酸化チタンマイクロチューブ上にて細胞培養後のLive/Dead染色像を示す。緑色蛍光は生細胞、赤色蛍光は死細胞である。培養1日目において死細胞が確認できるが、これは紫外線照射に伴う酸化チタンの光触媒活性による活性

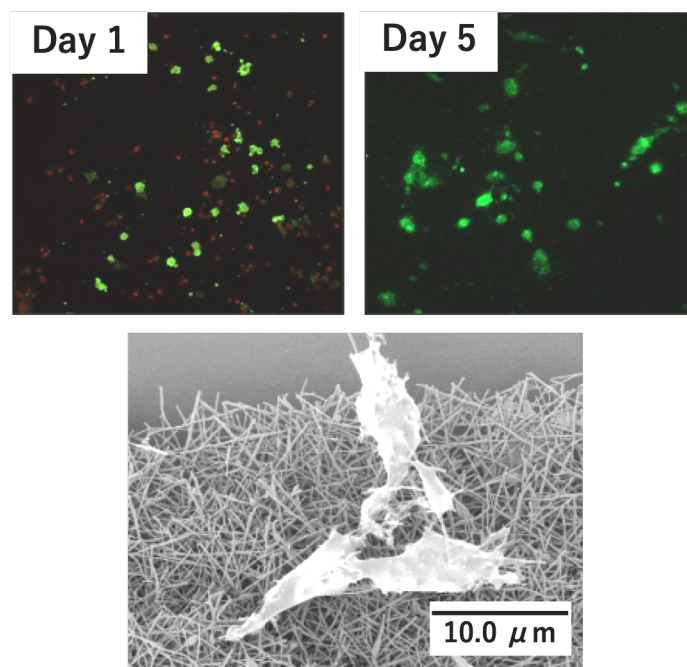


図 7 (上段) 酸化チタンマイクロチューブ膜上で培養したヒト間葉系幹細胞の Live/Dead 染色像 (下段) 酸化チタンマイクロチューブ上に接着したヒト間葉系幹細胞の SEM 像

酸素種の残存に伴うものと考えている。しかし5日目には、赤色蛍光は認められず、生細胞の伸展と増殖が確認された。これは活性酸素種の消滅により接着・伸展が生じたと考えるのが自然であり、滅菌操作の再検討が必要であろう。一方で、システムの設計次第では光触媒活性により細胞死を誘起させえとも考えられ、今後の展開が待たれる。次に酸化チタンマイクロチューブ上に接着したSEM画像を示す。10 $\mu$ mにも及ぶ針状構造のマイクロチューブが多数積み重なっていることが観察される。このマイクロチューブ薄膜にPVPは残存していないため、直接チューブ上に細胞が接着・伸展し増殖につながっており、このマイクロチューブ薄膜上での三次元凝集塊が接着した際の生存・伸展・成長について、マイクロチューブ構造をもたない酸化チタン膜との比較を今後引き続き検討を進めていく所存である。