

動物細胞のための三次元培養担体の開発に関する研究

金沢 英一^{*1} 山口 哲^{*1} 楠本 賢一^{*1}

Development of the Ceramics Based Cell Culture Carrier for Animal Cell

Eiichi Kanazawa, Tetsu Yamaguchi and Kenichi Kusumoto

哺乳類細胞を高密度に培養させるための担体（細胞の足場となる材料）の開発が望まれている。本研究では優れた細胞保持能力を示す新たな哺乳類細胞用担体の開発を目標とし、担体のベース材料に金属酸化物セラミックスを選択して培養用担体としての可能性について検討を行った。その結果、数種類の金属酸化物セラミックスが哺乳類細胞（CHO 細胞）に対する保持能力を示すことがわかった。また、CHO 細胞保持能力をさらに向上させるために、ベース材料の第二成分表面修飾処理による効果について検討を行った。その結果、貴金属や金属酸化物による表面改質により細胞保持能力は向上することがわかった。また、この哺乳類細胞培養用担体（金属表面修飾セラミックス担体）は、他の哺乳類細胞種も培養が可能であり安定なサイトカイン生産も行えることがわかった。

1 はじめに

三次元培養技術は、細胞自身が持つ組織形成能力や修復能力、または医療用タンパク質（サイトカインや抗体）の物質生産能力などを飛躍的に向上させることができるため、ティッシュエンジニアリングによる再生医療、医療用タンパク質生産、バイオデバイス（細胞を組み込んだ医療器具）の開発などを行うためのバイオツールとして非常に注目されている¹⁾。三次元培養において、細胞や組織を立体的な環境下で生育させるためには、それらに適した担体（細胞や組織の足場となる材料）の選択が重要である。しかし、一般的に用いられているリン酸カルシウム、ガラス、コラーゲン、セルロース等の担体は、特定の組織形成（例えば骨形成）や一部の培養細胞のために開発されたものであるため²⁾、神経細胞や肝細胞、初代培養細胞など多様な細胞種に適応することができない。また、細胞や組織の持つ機能を高度化するために重要な役割を担っている機能性タンパク質・ペプチドを固定化することが可能な担体の開発が望まれている。

そこで、一般的に用いられている培養担体と比較して優れた細胞保持能力（吸着・接着性）並びに細胞の高機能化を示すこれまでにない新たな哺乳類細胞用担体を開発するために、金微粒子等の貴金属あるいは金属酸化物を担体のベースとなるセラミックス粒子表面に高分散担持させた構造の金属表面修飾セラミックス担体を作製した。この適切な材料選択の基に作製し

た担体は、細胞培養環境下での耐食性にも問題はなく細胞毒性を示さなかった。さらに、ベースセラミックス粒子の表面上に存在する金微粒子は、細胞接着や細胞機能に關与するペプチド・タンパク質などの生体分子と高い結合能力を持っており、様々な細胞種への適応性の向上、細胞の高機能化を誘導する可能性がある。従って、この金属表面修飾セラミックス担体は三次元培養技術における医療用タンパク質の生産、人工臓器開発などを行うための重要なバイオツールとして貢献できると考えられる。

2 研究, 実験方法

2-1 金属表面修飾セラミックス担体の調製方法

哺乳類細胞培養担体のベース材料として使用した金属酸化物セラミックスである SiO₂（平均粒子径：約 140 μm）は、まず始めに加熱処理として 1000 で仮焼成を行った。第二成分である貴金属微粒子は Au, Pd, Ag 等を、金属酸化物微粒子は Al₂O₃, CuO, Cr₂O₃, Y₂O₃ 等をベース材料の表面上に高分散担持（固定化）させた。第二成分の添加方法は、貴金属コロイド溶液を用いる方法（コロイド法）、金属化合物を用いる方法（含浸法）により行った。第二成分の担持量は（担体の全重量に対する担持第二成分重量の割合（wt%））とした。第二成分を添加した試料は、十分な乾燥および混合を行った後、電気炉を用いて 600 ~ 1000 で、3 時間 ~ 5 時間の焼結処理を行い、ベース材料の表面上に貴金属微粒子や金属酸化物微粒子として固定化させた。

*1 生物食品研究所

2-2 金属表面修飾セラミックス担体の細胞保持能力の評価およびサイトカイン生産量の評価

哺乳類細胞 (CHO-EGFP 細胞: 蛍光タンパク質を発現させる CHO 細胞 (ハムスター卵巣細胞)) を各種金属表面修飾セラミックス担体を入れた 10%FBS - DMEM 培地中に混和させて静置培養を行った。培養条件 (担体の種類, 担体量, 細胞数, 培養時間) を設定して一定の時間経過後に担体のみ接着した細胞数を測定することにより金属表面修飾セラミックス担体の細胞保持能力を評価した。培養実験は同様の培養条件下で繰り返し数回行うことにより, 各条件における担体の細胞保持能力を決定した。CHO 細胞以外の哺乳類細胞種として, マウス神経芽細胞 (Neuro2a 細胞), ヒト胎児正常肝細胞 (HC 細胞) についても同様の方法で細胞保持能力の評価を行った。また, CHO-GM-CSF 細胞 (サイトカイン (GM-CSF) 産生 CHO 細胞) を用いて金属表面修飾セラミックス担体に接着した細胞によるサイトカイン生産量の評価を行った。

3 結果と考察

3-1 金属表面修飾セラミックス担体の細胞保持能力

金属酸化物セラミックスが哺乳類細胞培養用担体の材料に適切であるか確認するため, 一般的に使用され耐食性等が高く安定な性質を示すと考えられる金属酸化物セラミックスの中から SiO_2 , Al_2O_3 , Y_2O_3 , ZrO_2 等を選択して CHO 細胞培養を行った。その結果, これらは細胞培養環境下で腐食や細胞毒性などを示すことなく安定な CHO 細胞培養が可能で, 接着細胞数や細胞の接着形態が比較的良好であった。また, 一般的に用いられているリン酸カルシウムやガラス製の担体と比較したところ, ほぼ同様かそれより高い CHO 細胞保持能力を示すことが確認された。

そこで, 培養担体のベース材料として比較的安定であることを実証した数種類の金属酸化物の中で, 細胞の直径 10-20 μm 以上の粒子径, 細胞観察が可能, 培地中での耐久性などといった培養担体として必要な条件を満たす SiO_2 を開発目標とする金属表面修飾セラミックス担体のベース材料として採用した。しかし, 実際に SiO_2 ベース材料のみでの使用は, 様々な培養実験に対して適応が可能な培養担体としては十分な細胞保持能力とは言えないため, 次に SiO_2 への貴金属

上の可能性について検討を行った。

図 1 に SiO_2 に貴金属 (Au, Pd, Ag), 金属酸化物 (Al_2O_3 , CuO , Cr_2O_3 , Y_2O_3) を担持した金属表面修飾セラミックス担体の CHO 細胞保持能力を示す。図の縦軸は, 担体量 25mg, 播種細胞数 (5×10^5 個) に対して静置培養 24 時間後に担体に接着した CHO 細胞数を示している。第二成分である貴金属および金属酸化物はそれぞれについて SiO_2 への担持量を変えた数種類の担体を調製して細胞保持能力を評価した結果, いずれの担体も第二成分の担持量の違いにより細胞保持能力が変化する傾向を示した。図にはそのうちで最も高い細胞保持能力を示した各種担体の細胞保持能力を示しており, この図より第二成分の種類と担持量による SiO_2 の表面改質が細胞保持能力の変化に大きく影響を及ぼすことがわかった。また, Au- SiO_2 担体はこの中で最も高い細胞保持能力を示した。Au は, 細胞接着や細胞機能に関与する生体分子と高い結合能力を持つため, この親和能力が CHO 細胞に対して機能することで他の担体と比較して細胞保持能力を向上させたと考えられる。

3-2 Au 表面修飾 SiO_2 担体の CHO 細胞保持能力

金属表面修飾セラミックス担体それぞれについて, 細胞保持能力の再現性や担体の耐久性や安全性などに関する詳細な検討を行った結果, Au- SiO_2 担体が調製した種々の担体の中で最適な構造であると実証されたため, この系を用いてより詳細な CHO 細胞培養条件に関する検討を行った。まず, 0.001wt%, 0.01wt%, 0.1wt% の Au を担持した SiO_2 担体について, 担体量 10mg, 播種細胞数 (1×10^6 個) による一週間の CHO 細胞培養を行った。

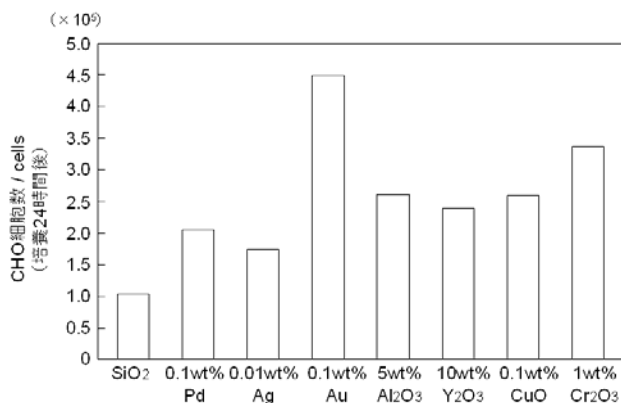


図 1 金属表面修飾 SiO_2 担体の CHO 細胞保持能力

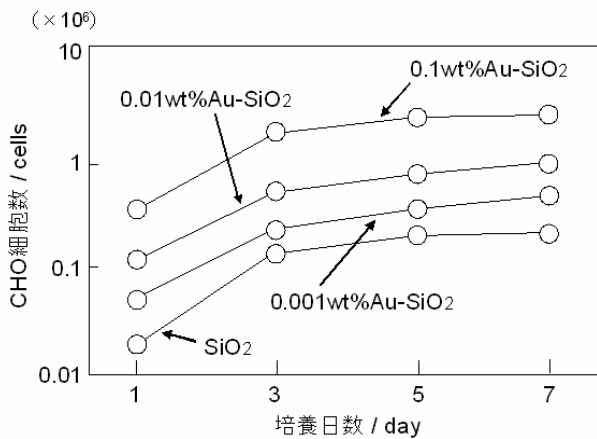


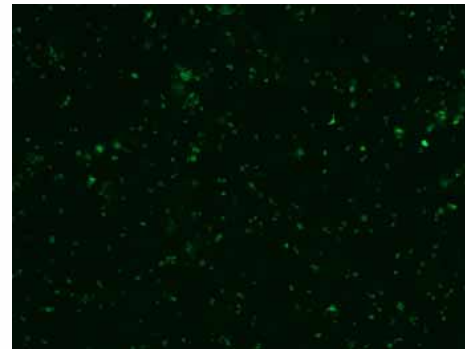
図2 Au表面修飾SiO₂担体のCHO細胞保持能力

図2にAu-SiO₂担体のCHO細胞保持能力を示す。これより、Au-SiO₂担体で安定なCHO細胞培養を行うことが可能であり、SiO₂と比較して接着細胞数はAu担持量の増加(0.001wt%~0.1wt%)に依存して大きく増加する傾向を示した。一方、この図には示していないが、0.1wt%以上の担持量については顕著な増加の傾向はなく0.1wt%とほぼ同等の細胞保持能力であった。また、培養3日目以降ではいずれの担体についても接着細胞数の増化量が小さくなっているため、担体量10mgに対して接着可能な細胞数がほぼ飽和状態に到達しているものと考えられる。従って、担体表面に存在するAu量の違いがCHO細胞保持能力の差として顕著に現れており、それが接着細胞数に反映されていることが十分に伺える。

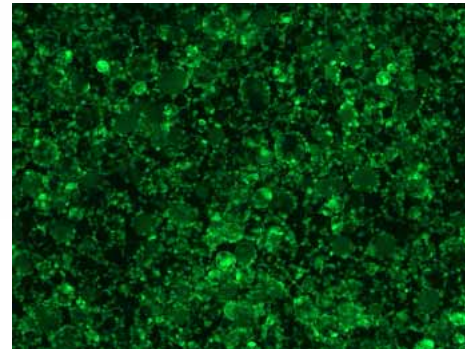
図3にAu-SiO₂担体のCHO細胞培養1日後、培養3日後の顕微鏡写真を示す。写真の明るい部分には担体に接着したCHO-EGFP蛍光細胞が存在しており、Auを担持することでCHO細胞は担体粒子全体に均一な状態で数多く存在することがこの写真から明らかである。また、SiO₂担体は細胞保持能力が低いため培養1日後の担体への接着細胞数が少ない結果、培養3日後にかけての細胞の増殖が小さい。これに対して、Au-SiO₂担体はAuによる優れた細胞保持能力により培養1日後でも比較的多くの細胞が均一な状態で担体に強固に接着している結果、培養3日後にかけての細胞の増殖も大きい。その結果、この両者の担体の間では接着細胞数に著しく大きな差が現れていると考えられる。

3-3 Au表面修飾SiO₂担体を用いたサイトカイン生産量の評価

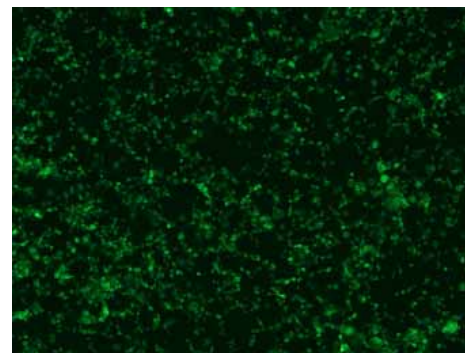
Au-SiO₂担体に接着したCHO細胞によるサイトカイ



SiO₂担体(培養1日後)



0.1wt%Au-SiO₂担体(培養1日後)



SiO₂担体(培養3日後)



0.1wt%Au-SiO₂担体(培養3日後)

図3 Au表面修飾SiO₂担体のCHO細胞培養写真

ン(GM-CSF)生産量の評価を行った。図4に担体量10mg、播種細胞数(1×10⁶個)の条件でAu-SiO₂担体を用いて一週間培養したCHO細胞による24時間当たり1mlの培地に含まれるサイトカイン生産量を示す。サ

イトカイン生産量は細胞数に依存するため、担体に接着した細胞数が多くなれば高い数値を示す。また、SiO₂ へのAu担持量の増加により担体に接着するCHO細胞は増大することは図2から明らかである。従って、図4からAu担持量が多く培養日数の経過した担体ほど接着CHO細胞数が多いためサイトカイン生産量は高い数値を示し、その数値はCHO細胞数にもほぼ依存している結果が得られているため、Au-SiO₂ 担体が担体表面における細胞の増殖とサイトカイン生産に対して最適な環境を与えていると考えられる。

3-4 Au 表面修飾 SiO₂ 担体の他の哺乳類細胞保持能力

CHO 細胞以外の哺乳類細胞種として、一般的な培養細胞と比べ細胞接着が難しいとされているマウス神経芽細胞 (Neuro2a 細胞), ヒト胎児正常肝細胞 (HC 細胞) について, Au-SiO₂ 担体による細胞培養が可能であるかについて検討を行った。その結果, 図5に示す写真から明らかなように, Au-SiO₂ 担体は SiO₂ 担体と比較して高い Neuro2a 細胞保持能力 (担体量 10mg, 培養 5 時間) を示した。また, HC 細胞についても同様の検討を行った結果, SiO₂ 担体と比較して Au-SiO₂ 担体は高い細胞保持能力を示し, この両者の細胞については CHO 細胞の場合と同様に Au-SiO₂ 担体で良好な細胞培養が可能であることがわかった。

4 まとめ

金属酸化物セラミックスによる新たな哺乳類細胞培養用担体としての可能性について検討を行った結果, SiO₂ を担体のベース材料に選択して, 第二成分種として Au 微粒子を SiO₂ 表面に高分散担持させた Au-SiO₂ 担体は SiO₂ 担体と比較して CHO 細胞保持能力を飛躍的に向上させることができた。この傾向は, CHO 細胞保持能力の Au 担持量による影響やそれに基づくサイトカイン生産量の検討から明らかとなり, Au-SiO₂ 担体が最適な培養環境を提供する可能性を十分に備えていることが示唆された。また, Au-SiO₂ 担体は細胞接着や細胞機能に関与する生体分子と高い結合能力を持つ Au が担体表面上に分散したこれまでにない担体であり, 様々な細胞種への適応性の向上, 細胞の高機能化を誘導する可能性がある。この点については, 一部の哺乳類細胞 (Neuro2a 細胞, HC 細胞) を用いた培養実験により適応能力の可能性のあることを実証した。

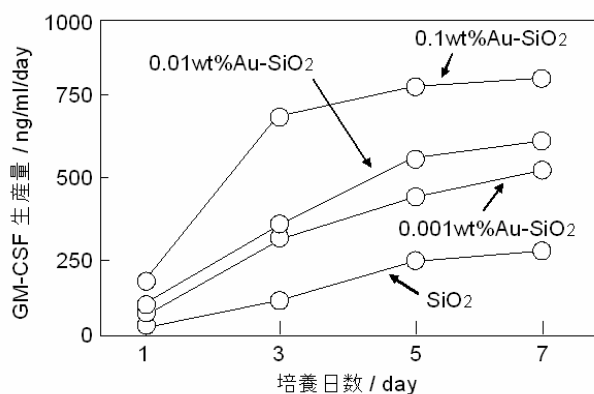
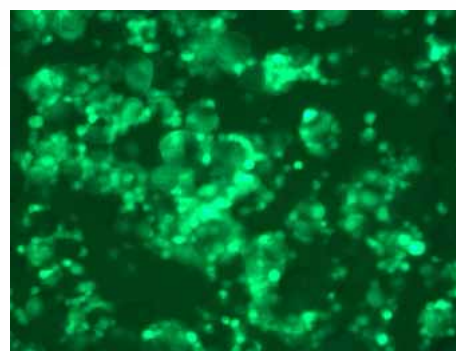
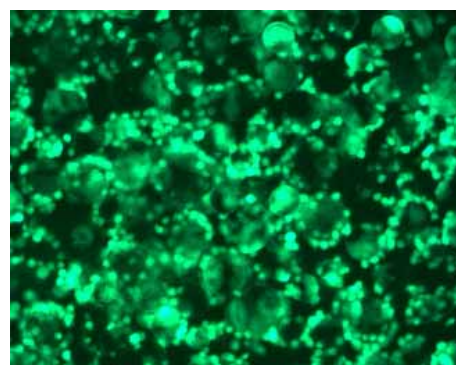


図4 Au 表面修飾 SiO₂ 担体を用いて培養した CHO 細胞による 24 時間当たりの GM-CSF 生産量



SiO₂ 担体 接着細胞数: 約 2×10^5 cells



0.1wt% Au-SiO₂ 担体 接着細胞数: 約 5×10^5 cells

図5 Au 表面修飾 SiO₂ 担体の Neuro2a 細胞培養写真

従って, 今回開発を行った金属表面修飾セラミックス担体は, 今後必要とされる様々な哺乳類細胞種に適応可能な担体としての可能性を十分に持っているため, 新たな哺乳類細胞用担体としてバイオテクノロジー関連分野に大きく貢献できると考えられる。

5 参考文献

- 1) Strain AJ, et al. : Science, **295(5557)**, pp.1005-9(2002)
- 2) Lagasse E, et al. : Immunity, **14(4)**, pp.425-36(2001)