エレクトロスピンニング法により作製されるファイバーの骨再生および遺伝子導入用基材としての検討

境 慎司¹⁾, 山口 哲²⁾, 川上 幸衛¹⁾

SAKAI Shinji¹⁾, YAMAGUCHI Tetsu²⁾, KAWAKAMI Kouei¹⁾

¹⁾九州大学, ²⁾福岡県工業技術センター

1. はじめに

エレクトロスピンニング法は、溶液に高電圧を印可するだけで簡単にナノファイバーを作製できる方法である。この技術の由来は1930年代にさかのぼるかなり古いものであるが、“ナノ”にかかわる研究が注目されるようになった1990年代からより多くの研究が行われるようになってい。従来の構造体と比較して、ナノスケールのファイバーにすることにより、表面積が飛躍的に増大することから、これによって性能の向上が期待できるフィルターや分離膜などとしての用途開発が行われている。これに加えて、バイオ分野への応用に関する研究報告も多く行われており、ティッシュエンジニアリング（組織工学）用の細胞培養担体への利用に関して、特に多くの研究報告が行われている。動物細胞培養担体への適用に関しては、既存の細胞培養担体用の材料からいかにしてファイバーを作製するか？という研究報告が2年ほど前までは多くなされていたが、現在では、いかにして高機能化するか？いかにして微小な径であることの利点を活かすのか？といったことに研究の焦点は移行してきているようである。本稿では筆者らが行っているエレクトロスピンニング法により得られるシリカファイバーの骨再生用の担体としての可能性に関する検討、およびエレクトロスピンニングファイバーを利用した、動物細胞への遺伝子導入に関する検討に関して紹介を行う。

2. シリカファイバーの骨再生用の担体としての可能性

私たちの身の回りに存在するガラスは、一般に原料粉末を1500℃以上の高温で加熱・融解させて液体とし、これを冷却する方法によって製造されている。ゾル・ゲル法はこのような加熱・融解を必要とする方法と比較し、はるかに低温でガラスやセラミックスを作製できる方法として1950年前後から検討・利用が行われている方法である。具体的には、金属の有機または無機化合物を含む溶液から出発し、これらの加水分解と脱水縮合反応をある程度進行させてゾルを得て、さらにそれらの反応を進行させることでゲル化させた後に加熱によって、シリカやチタニアなどの酸化物固体を作製する方法である（図1）。テトラエトキシシランからのシリカの生成を例に挙げると、その反応は次のように進行する。

$$n\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4 + 4n\text{H}_2\text{O} \rightarrow n\text{Si}(\text{OH})_4 + 4nC_2\text{H}_5\text{OH} \quad (\text{加水分解反応})$$

この反応で生成した $\text{Si}(\text{OH})_4$ は反応性に富み、脱水縮合して $\equiv\text{Si}-\text{O}-\text{Si}\equiv$ のつながった SiO_2 固体となる。

$$n\text{Si}(\text{OH})_4 \rightarrow n\text{SiO}_2 + 2n\text{H}_2\text{O} \quad (\text{脱水縮合反応})$$

このような反応によって生成するシリカやチタニアは、生体内で拒絶反応を受けずに骨の無機物質と同種のアパタイトの層が表面に形成し、このアパタイト層を通して骨と結合する生体活性を有する¹⁾など生体やさまざまな動物細胞に対して、高い親和性を有していることが多数報告されている。このため、単独もしくはその他の

図1 テトラエトキシシランを出発原料とするゾル・ゲル反応を経るガラス合成プロセス

材料と複合した薬物徐放担体²⁾や、体内埋め込みデバイスの被覆材料³⁾、さらに動物細胞を生存したまま包括するための材料⁴⁾としての検討も行われている。なお、ゾル-ゲル反応を経て得られるシリカやチタニアがアパタイト結晶の核形成を起こす詳細なメカニズムは明らかになっていないものの、図2に示されるように負に帯電するSi-OHやTi-OHが、まずカルシウムイオンを引き寄せ、そのカルシウムイオンが逆の電荷のリン酸イオンを引き寄せるためではないかと考えられている。

ところでゾル-ゲル反応を利用すると、加水分解・脱水縮合反応の進行によって粘度が高くなったゾルから直接ゲルファイバーを引き、その加熱によってガラスやセラミックスのファイバーを得ることも可能である。エレクトロスピンニング法を用いてシリカファイバーを作製する際には、この粘度が高くなったゾルに高電圧を印可することにより、紡糸することが可能である。著者らが行っている手順は、テトラエトキシシランと塩酸、水、エタノールを1:2:2:0.01のモル比で混合したものを80度のオープン中に30分静置して得られるゾルを冷却後シリンジに充填し、15kVの電圧を印可した20ゲージのステンレス注射針から0.2 ml/分の速度で押し出し、針の先端から10 cmの距離にあるアースに接続した金属ドラムに回収するというものである。この方法によって、図3に示されるような直径数百ナノ-1 μm 程度のシリカファイバーからなる不織布を得ることができている。

前述したように一般的なゾル-ゲル反応を経て得られるシリカをバイオ分野に応用する際の魅力的な特徴の一

つは、体液と接触した際に表面にアパタイト析出が起ることである。そこで、エレクトロスピンニング法を経て得られるシリカファイバーも同様の性質を有しているのかを、体液とほぼ同じイオン組成の疑似体液⁵⁾にこのファイバーを浸すことによって確認した。その結果を示したものが図4であるが、37度の疑似体液に1週間浸した不織布を乾燥後、電子顕微鏡によって観察を行ったところ、繊維の一本一本に球状の析出物が観察された。この析出物のX線回折パターンにはアパタイトの存在に起因するピークが現れ（図5）、さらに元素分析によって測定されたリンとカルシウムの含有比からもアパタイトであることが確認された⁶⁾。

上記の検討からエレクトロスピンニング法を用いて作製されるシリカファイバーが生体活性を有していることが示されたわけであるが、さらに、骨芽細胞との親和性を

図4 疑似体液に1週間浸した後のファイバー⁶⁾

図2 アパタイト核形成機構模式図

図3 シリカファイバー (a:低倍率, b:高倍率)⁶⁾

図5 疑似体液に浸す前と浸して7日後の試料のX線回折パターン（点線：アパタイトのピーク位置）⁶⁾

調べることで骨再生・修復用材料としての評価を行った。この種の検討によく利用されるヒト骨肉腫由来の細胞株（MG63）を播種してその接着および増殖挙動を経時的に観察したところ、播種翌日には細胞が繊維を包み込むように接着・伸展し、その後も順調にその上で増殖した（図6）。さらに培養を続けると、培養1週間程度で骨細胞への分化を示すマーカーを発現した。これらの結果は、エレクトロスピニング法によって得られるシリカファイバーが骨芽細胞に高い親和性を有することを示すものであると考えられる。なお、強度を考慮すると、エレクトロスピニング法により得られるシリカファイバー不織布を実際に利用する場合には、大きな荷重の負荷を考慮しなければならないような大規模な骨の欠損の修復というよりもむしろ、荷重の負荷を考慮する必要のないような小規模な骨欠損の修復用として適当ではないかと考えている。

3. ファイバーを利用した動物細胞への遺伝子導入

材料をナノファイバー化することによる最大の利点は、表面積が飛躍的に増大することであり、この利点を利用できるような用途の開発が重要である。上述のシリカファイバー表面へのアパタイト析出も、ファイバー表面の官能基を利用したものであることから、その利点を利用したものと言えるだろう。我々はさらに、動物細胞や組織への遺伝子導入の用途においてもこの利点を活かせるのではないかと考えた。

動物細胞への遺伝子導入法としては、リン酸カルシウム共沈法やマイクロインジェクション法などさまざまな方法が知られている。また、最近では、組織構築の鋳型となる多孔体の表面やその骨格の内部にプラスミドDNAを固定化しておくことによって、その表面で増殖

図6 シリカファイバー上のMG63細胞の蛍光顕微鏡写真（a: 1日目, b: 5日目）⁶⁾

し組織を形成する細胞に高効率で遺伝子を導入できることが報告されている^{7,8)}。高効率での遺伝子導入が可能な理由は、細胞が接する材料から徐々にDNAが放出されることによって、細胞の周囲環境中のDNA濃度が高く保たれるためと考えられている。このアプローチをエレクトロスピニングファイバーから作られる細胞培養担体に適用するに当たっては、DNAを存在させる場所としてファイバー内部と表面が考えられるわけであるが、我々は、ファイバー材料を溶解させる際の溶媒の影響によるDNAへのダメージを考慮する必要がなく、大きな表面積という利点をより活かすことができると考えられる。後者のファイバー表面へのDNAの担持を採用した。使用したファイバーはクロロホルムを溶媒として作製可能なポリ乳酸のファイバーである。なお、ポリ乳酸は生分解性の材料であることから、エレクトロスピニング法を経て作製されるファイバーに関して細胞培養用の基材としてさまざまな検討が行われている。また、その表面にDNAを担持させた場合には、材料の分解にともない、担持されたDNAが周囲の環境中に放出されるものと考えられる。ポリ乳酸ファイバーへのDNAの担持には、Layer by Layer法を利用した。この方法は、負に帯電しているプラスミドDNAを溶解させた水溶液と正に帯電したポリエチレンイミンを含む水溶液にファイバーを交互に浸漬することによって静電的な結合の生成を利用してこれらの溶質をファイバー上に積層させるものである。なお、基材表面への物質の担持にLayer by Layer法

図7 異なる濃度のDNA溶液に浸して作製したDNA担持ポリ乳酸ファイバーの蛍光顕微鏡写真¹⁰⁾ 図8 溶液中pGL3濃度と担持DNAに起因する蛍光強度の相関¹⁰⁾ 図9 積層数と担持DNAに起因する蛍光強度の相関¹⁰⁾

を利用することの利点としては、溶液濃度や浸漬を繰り返す回数によって容易に担持量をコントロールできることが挙げられる⁹⁾。

図7に、0.017 mg/mlもしくは0.870 mg/mlのpGL3プラスミド水溶液と1.0%のポリエチレンイミン水溶液に交互に2回浸漬した後へヘキスト33342を用いてDNAを蛍光染色したポリ乳酸のファイバーの蛍光顕微鏡写真を示す。白く見える部分が蛍光試薬で染色されたDNAが存在する部分であり、DNA濃度が高い溶液に浸したファイバーの方が強い蛍光を示した(図8)¹⁰⁾。この結果から、エレクトロスピンニングファイバー表面に対してもLayer by Layer法でプラスミドDNAを担持させることが可能であり、溶液濃度によってその担持量を変化させることが可能であることが明らかとなった。浸漬回数の影響に関しては、浸漬の繰り返し回数を増加させることによって、DNA担持量を増加させることが可能であった(図9)。また、COS7細胞を用いた検討から、このような操作によってDNA担持量を操作することで遺伝子導入効率を制御できることが明らかになった(図10)。他の形状の担体の比較として、ポリ乳酸の平板を作製してその表面にポリエチレンイミンとpGL3のコンプレックスを2層形成させたものと、ポリ乳酸ファイバー上に同様に積層させた試料を作製し、COS7細胞への遺伝子導入効率を比較した。その結果、ファイバー上の細胞へ

図10 積層数と遺伝子導入効率の相関¹⁰⁾

の遺伝子導入効率の方が最大で2倍以上高いという結果が得られた。ここで「最大で」と書いたのは、作製したポリ乳酸ファイバーのロット毎に導入効率にばらつきが大きかったためである。このばらつきは、ロットごとにファイバー密度に差があり、ファイバー間での細胞塊の形成の程度などに差が生じたためと考えている。このような導入効率のばらつきをなくするためには、ファイバー間の距離やファイバー同士の絡み具合が、細胞の大きさ程度のスケールでロットごとに異なることがなくなるようにする必要があると考えられる。なお、このようなファイバー間距離やファイバー密度を厳密に制御すること

に関しては、様々な検討が行われており、その方法の確立は今後の大きな課題であると考えられる。

4. おわりに

本稿では著者らの研究の紹介としてエレクトロスピンニング法によって作製されるシリカファイバーを骨再生・修復材料として利用することの可能性ならびにポリ乳酸ファイバー表面にDNAを担持させて、動物細胞への遺伝子導入に利用する検討に関して紹介を行った。現状では、ナノスケールにすることによって飛躍的に表面積が増大することを十分に活かしているとはまだ言えないかもしれないが、今後はさらにこの特性を活かすこと

を考えた研究を展開していく予定である。

参考文献

- 1) Li PJ et al, J Am Ceram Soc 75: 2094-2097 (1992)
- 2) Ahola MS et al, Biomaterials 22: 2163-70 (2001)
- 3) Yoshida K et al, J Biomed Mater Res 48: 778-785 (1999)
- 4) Pope EJA et al, Ceram Trans 55: 33-49 (1995)
- 5) Oyane A et al, J Biomed Mater Res 65A: 188-195 (2003)
- 6) Sakai S et al, Biotechnol J 1: 958-962 (2006)
- 7) Shea LD et al, Nat Biotechnol 17: 551-554 (1999)
- 8) Jang JH et al, Expert Rev Med Devices 1: 127-138 (2004)
- 9) Hirsjarvi S et al, Colloid Surface B 49: 93-99 (2006)
- 10) Sakai S et al, J Biomed Mater Res A. DOI: 10.1002/jbm.a.31870

境 慎 司 (さかい しんじ)

平成 10 年，九州大学工学部化学機械工学科卒，同 14 年，九州大学工学部物質プロセス工学専攻博士課程修了，同年，九州大学大学院工学研究院助手に採用，現在，九州大学工学研究院助教，博士（工学）。

山 口 哲 (やまぐち てつ)

平成 14 年，九州大学工学部物質化学工学科卒，同 16 年，九州大学工学部化学システム工学専攻修士課程修了，同年，福岡県職員に採用，現在，福岡県工業技術センター生物食品研究所に勤務，主任技師，平成 18 年，九州大学大学院工学部物質プロセス工学専攻入学（博士後期課程社会人），修士（工学）。

川 上 幸 衛 (かわかみ こうえい)

昭和 45 年，九州大学工学部化学機械工学科卒，同 50 年，九州大学工学部助手，平成 9 年，九州大学工学研究科教授，現在，九州大学大学院工学研究院教授，工学博士。