討論会の話題から

第59回放射線化学討論会

放射線架橋ゼラチンハイドロゲルの開発と機能性足場材料への応用

国立研究開発法人 量子科学技術研究開発機構　大山 智子*

1　はじめに

生体内環境を模擬した「足場」（細胞や組織を培養する土台）は，先端医療・バイオ研究に欠かせない材料である．特に細胞の接着・増殖・分化等の機能を制御できる機能性足場の開発は，再生医療実現のカギといわれており，生体適合性が高く，かつ，細胞に影響を与える形状や物性を自在に制御した機能性足場の開発が望まれている．

生体内の細胞外マトリクスの主成分であるコラーゲンから得られるゼラチンは，生体内環境を模擬する足場には有力な材料である．しかしながらゼラチンのゾル-ゲル転移温度は培養温度（37 °C）に近いため，そのまま使用することはできない．現状ではホルムアルデヒド等の有毒な架橋剤で不溶化処理されており，細胞毒性が問題になっている．

そこで本研究では，架橋剤等の薬剤を一切用いることなくゼラチンを放射線架橋させ，生体適合性の高いゼラチン足場を作製した．さらに，細胞機能を制御させる機能性足場への応用を検討したので紹介する．

2　放射線架橋ゼラチンハイドロゲルの開発

50 °C で溶解させたゼラチン（豚由来，Type A）水溶液を 20 °C で物理ゲル化したもの（いわゆるゼリー）をサンプルとし，^{60}Co γ 線（10 kGy/h）を空気中で照射した．未照射のゼラチンは温めると溶けてしまうが，10 kGy 以上照射したサンプルは 50 °C に加熱しても形状を保っており，放射線架橋ゼラチンハイドロゲルが得られたことがわかった[1]．未架橋成分を 50 °C 水中で洗い流すと，照射線量やゼラチンの濃度に応じてゲルの硬さが変化することがわかった．

なお，得られたゲルからはアルデヒドや有機酸など細胞毒性を有する成分は検出されず，さらに，生分解性を保っていることも確認された．そこで，このゲル内の水を培地に置換したものを，足場として利用できないか検討した．

3　機能性足場の開発

生体適合性・生分解性に加え，放射線架橋ゼラチンハイドロゲル足場（RX-GS）の大きな特徴は，その硬さを添加剤なしで制御できるということである．

例として，Fig. 1 にゼラチン水溶液 10 wt% で作製した RX-GS のゲル分率と圧縮弾性率を示す．照射線量によって，RX-GS の硬さを軟組織培養に適していると

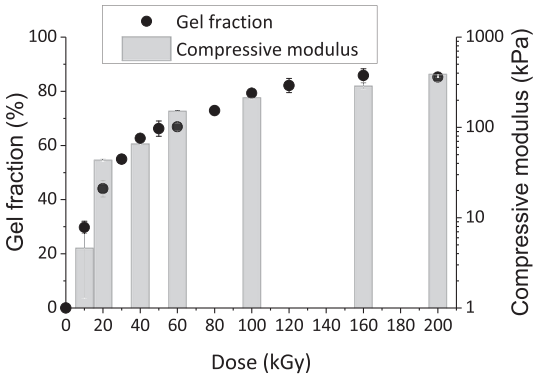

Figure 1.　Gel fraction and compressive modulus of the RX-GS.

Reagent-Free Radiation-Crosslinked Gelatin Hydrogel for Functional Scaffolds
Tomoko G. Oyama* (*National Institutes of Quantum and Radiological Science and Technology*),
〒370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233
TEL: 027-346-9209, E-mail: ohyama.tomoko@qst.go.jp

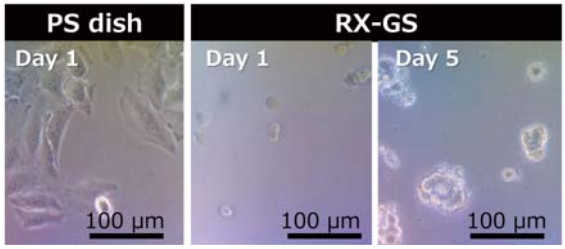

Figure 2.　Optical microscope images of HeLa cells cultured on PS dish (left) and on RX-GS with the compressive modulus of approximately 40 kPa (right), respectively.

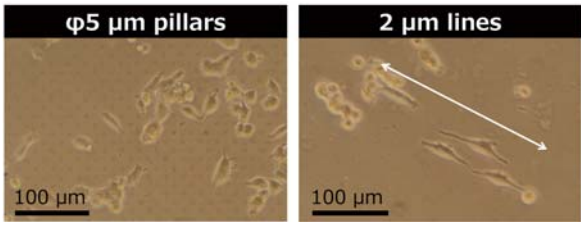

Figure 3.　Optical microscope images of HeLa cells cultured on RX-GS with the surface profile of ϕ5 μm pillers (left) and 2 μm 1:1 lines and spaces (right).

いわれる[2]kPa オーダーの広い範囲で制御できることがわかる．

さらに本研究では，細胞の伸展に影響を与えるといわれているマイクロ形状を RX-GS 表面に加工するため，「量子ビームナノインプリント（QB-NIL）」技術を用いた微細加工を検討した．QB-NIL は放射線による架橋・改質と成型を同時に行う技術である[3,4]．ゼラチン水溶液を型（モールド）に流し込んで物理ゲルを作製し，γ 線を照射して架橋・成型を行ったところ，数ミクロンの形状を RX-GS 表面に作製することに成功した．

4　細胞培養試験

RX-GS を用いた細胞培養試験は，モデル細胞である HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来）を用いて行った．Figure 2 に通常培養に使用されるポリスチレン（PS）ディッシュと，硬さ約 40 kPa に調整した RX-GS を用いて培養した HeLa 細胞の様子を示す．

PS ディッシュ上では細胞は平らに広がっているが，RX-GS 上では丸く，やがてスフェロイド（細胞塊）を形成した．このような 3 次元的な細胞増殖は PS ディッシュなど硬い材料の上では見られない現象である．RX-GS の硬さや性質が生体内環境に近いために，HeLa 細胞の体内での増殖過程を模擬できたと考えられる．また，細胞の形態は RX-GS の硬さに応じて変化することもわかった．

次に，QB-NIL で表面をマイクロ加工した RX-GS 上での HeLa 細胞培養例を示す（Fig. 3）．直径 5 μm のピラーや，幅 2 μm のライン・アンド・スペースなどが RX-GS に形成され，その微細形状に HeLa が応答して仮足（足のような役割を果たす細胞膜の突出）を伸ばしたり，伸展方向を変える様子が見られた．

硬さと微細形状はどちらも細胞に影響を与えるパラメータであり，RX-GS でその両方をすることによって，細胞応答を制御することができると考えられる．

5　まとめ

架橋剤を使わずに，放射線架橋技術によって「溶けないゼラチン」を開発した．架橋密度の制御と QB-NIL 技術によって，硬さや微細形状を制御した機能性足場を開発し，細胞形態や細胞伸展を変化させることに成功した．足場による細胞機能の制御技術は，再生医療研究における分化誘導のカギであり，本研究で開発した RX-GS の今後の応用が期待される．

〈謝　辞〉

実験をサポートいただいた業務補助員の目崎涼子氏に感謝申し上げます．本研究は JSPS 科研費若手研究（B）26790070 の助成を受け実施しました．

〈参 考 文 献〉

1) K. Haema, T. G. Oyama, A. Kimura, M. Taguchi, Radiat. Phys. Chem., 103 (2014) 126.
2) A. J. Engler, S. Sen, H. L. Sweeney, D. E. Discher, Cell, 126 (2006) 677.
3) S. Okubo, N. Nagasawa, A. Kobayashi, T. G. Oyama, M. Taguchi, A. Oshima, S. Tagawa, M. Washio, Appl. Phys. Express, 5 (2012) 027303.
4) 大山智子，第 19 章 “量子ビームナノインプリント” による高分子の改質と微細加工，監修：鷲尾方一，前川康成「EB 技術を利用した材料創製と応用展開」，2016，189–198.