

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

(1/1)

研究題目	超音波による細胞コーティング技術	報告書作成者	小山大介
研究従事者	小山大介, 丸山悠輝		
研究目的	<p>特定の細胞を増殖させ、同じ性質を持つこれらの細胞に対して薬効を調査するスクリーニングを一度に行えることから、細胞培養技術は医学、薬学、遺伝子工学の発展には必要不可欠なものと言える。これらのスクリーニング調査は、単一の細胞のみに留まらず、細胞間コミュニケーションの様な細胞同士の相互作用を評価することも重要である。そのため、実施者の技能に依ることなく、細胞を任意の位置に高い精度で操作・配置する培養制御技術が求められている。現在、培養制御技術として、MEMS技術を利用した培養容器への微細加工による手法やレーザー光による制御手法などが国内外の様々な研究グループによって報告されている。しかしながら微細加工技術では、細胞の特性によってその仕組み、形状を最適化する必要があるため汎用性に欠け、培養時におけるコンタミネーションのリスクも伴う。光ピンセットと呼ばれるレーザー光を用いたパターンニング技術では、単一細胞を捕捉・操作可能であるが、細胞の熱的損傷や、コスト面、装置の大型化などの課題がある。</p> <p>一方で我々の研究グループでは現在、上記の従来技術とは全く異なる、超音波振動を用いた細胞培養制御技術について検討している。細胞培養ディッシュに励起される超音波振動により、非接触で細胞の培養環境を制御することで、コンタミネーションのリスクを伴わず、比較的低コストかつ簡易なシステムを構築できる。本技術の将来的な応用例としては、人工関節表面への細胞配向制御技術(ここでは“細胞コーティング技術”と呼ぶ)が挙げられる。人工関節手術では患者の生体骨への親和性を考慮し、人工関節表面をハイドロキシアパタイトでコーティングを行うが、この人工関節の表面コーティングと生体骨界面における骨の配向(組織の向き)関係は、癒合までの治癒期間および癒合界面の強度に強く影響を与える。そのため、ハイドロキシアパタイトコーティングの成膜条件によって所望の配向を実現する研究が進められているが、人工関節表面は曲面など複雑形状を有するため、所望の配向制御を行うことは現在のところ困難とされている。</p> <p>そこで本研究では、超音波によって成長過程における生物の細胞・組織配向を制御する技術について検討する。今後、事前に患者から採取した幹細胞を用い、培養時に超音波によって組織配向を制御した細胞塊を従来の人工関節と併用し、生体骨との親和性を高めることで、人工骨手術後の治癒期間短縮に貢献することが期待される。特に今回実施した当研究では、その実現可能性を探るファーストステップの位置付けとして、培養ディッシュ底面に励振した超音波たわみ振動を用いた接着細胞の培養制御およびその成長方向制御について検討した。</p>		

研究内容	<p>本研究では、超音波による細胞配向制御技術について以下の項目を検討した。</p> <p>1. 超音波細胞培養デバイスの開発</p> <p>a. 生体内において単一細胞や細胞間で起こる現象を再現し理解するためには、in vitro において細胞をディッシュ内の任意の位置へ配置し、細胞および細胞間コミュニケーションをリアルタイム観測することが重要である。本研究ではまず、超音波によって細胞を培養ディッシュ上の任意の位置・方向に成長させる細胞パターンニングとその成長を定量的に評価可能な超音波ディッシュの開発を行った。今後の汎用性を考慮し、一般的な細胞培養ディッシュと超音波振動子を組み合わせた超音波ディッシュを作製した(図1)。超音波培養ディッシュの底部に周波数 20 kHz 以上の超音波振動を発生させると、ディッシュの底部の存在する培養細胞に超音波の放射力が作用し、周期的位置に細胞は接着・成長する。また超音波振動モードを制御することによってその振動パターンを変化できることから、様々な細胞配向を実現できることが期待される。</p> <p>b. 細胞・組織配向は、ディッシュに発生する超音波振動パターンに依存するため、上項 a の基本構造を元に、細胞成長にとって最適な超音波周波数において所望の振動パターンとなる様、有限要素解析によるコンピュータシミュレーションによってディッシュおよび圧電超音波振動子の形状を決定し、超音波細胞培養ディッシュの設計・試作を行った。培養ディッシュ内の培養液もシミュレーションモデルに組み込むことにより、培養液内の音場が細胞培養に与える影響についても検討した。</p> <p>2. 細胞成長および組織配向制御</p> <p>a. 超音波振動が細胞成長およびその配向について与える影響を定量的に評価するための手法について検討した。評価システムは、今回設計・開発した超音波細胞培養ディッシュ、温度を一定(37℃)に保ちながら超音波駆動可能な小型恒温槽、傾向顕微鏡で構成される。超音波振動下における細胞成長の経時変化を連続的に画像観測し、画像処理によって細胞の配向方向を定義し、細胞配向性を定量的に評価した。</p> <p>b. 超音波条件(振動振幅とその分布)が細胞成長および配向に与える影響について実験的に検討した。培養ディッシュ底部のガラス板に軸対称の同心円状のたわみ定在波モードを励振することによって、細胞成長および配向と細胞周囲の振動分布との関係性について検討した。また超音波振動による細胞の遺伝子発現の変化を明らかにするため、超音波励振前後の細胞から RNA を抽出し、全遺伝子をリアルタイム PCR 法により網羅的に解析した。</p>
------	---

研究概要報告書【サウンド技術振興部門】

(1/1)

<p>研究のポイント</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 報告者らのグループはこれまでに超音波による微小物体の非接触マニピュレーション技術について数多くの研究報告を行っている。本研究では、これらの研究によって得た知見を活かして、これまでに報告のない細胞配向制御技術について検討を行った。 ● 本研究で新たに提案する超音波細胞培養技術では、単に既存の装置を組み合わせるのではなく、培養ディッシュの設計・試作から細胞の遺伝子解析までを行うため、超音波工学、生体工学、遺伝子工学など幅広い分野に渡る知識・技術が必要となり、これらの学術分野においても非常に新規性、発展性が大きい研究と言える。 ● 超音波振動は少なからず伝搬減衰によって発熱が生じるため、超音波と熱が細胞成長に与える影響をいかに切り分けて考察するかがキーとなる。 ● 細胞実験では再現性が重要となるが、配向性評価のためには長時間を要するため、この問題をいかに解決するかが重要となる。
<p>研究結果</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 有限要素解析によるコンピュータシミュレーションによって、超音波細胞培養ディッシュを設計・開発した(図 1)。本デバイスは円環状の圧電超音波振動子、ガラス円板、一般的なガラス底部を有する細胞培養ディッシュで構成される。超音波ディッシュに周波数 83 kHz の連続正弦波電気信号を入力することにより、ディッシュのガラス底部に軸対称の同心円状のたわみ定在波を発生させた(図 2)。 ● 上項条件において、細胞成長を蛍光顕微鏡によってタイムラプス観察した。ディッシュ底部中心を原点とする円筒座標を定義し、細胞成長・配向性を定量的に評価した結果、超音波非励振時(コントロール)と比較して、超音波振動下において細胞はディッシュの接線方向(円周方向)に配向することが明らかとなった(図 3)。また、この傾向は入力電気信号、すなわち超音波振動振幅の増加と共により顕著となった(図 4)。 ● 超音波振動による細胞長さを測定した結果、超音波非励振時と比較して、超音波振動下では細胞成長が促進される結果を得た。一方で超音波非励振時において温度上昇させた場合はこの成長促進は観測されなかったことより、超音波振動そのものが細胞成長の一因であることが示唆された。
<p>今後の課題</p>	<ul style="list-style-type: none"> ● 超音波振動分布と細胞配向の関係性については明らかになったものの、そのメカニズムについては推量の域を出ず未解明のままである。現在遺伝子解析によるアプローチを行っており、これらの結果を組み合わせることによりその物理メカニズムが明らかになることが期待される。 ● 本研究期間では一種類の細胞(神経細胞)のみによる検討に終わった。本技術の様々な実用展開を考慮すると、次のステップとして骨芽細胞、筋芽細胞、血管内皮細胞を用いた配向制御について検討する必要ある。また再生医療分野への展開も視野に入れ、細胞シート培養技術についても検討を行う。

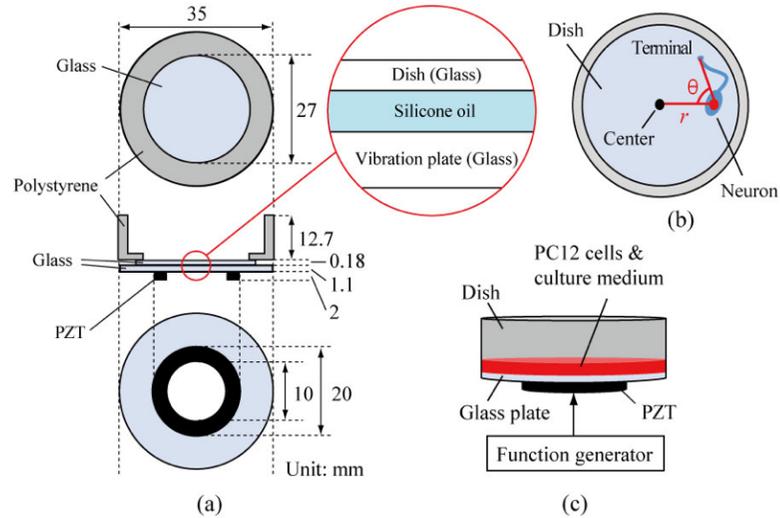


図1 超音波細胞培養ディッシュ構造

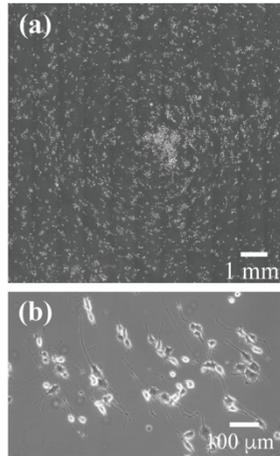


図3 細胞配向のようす

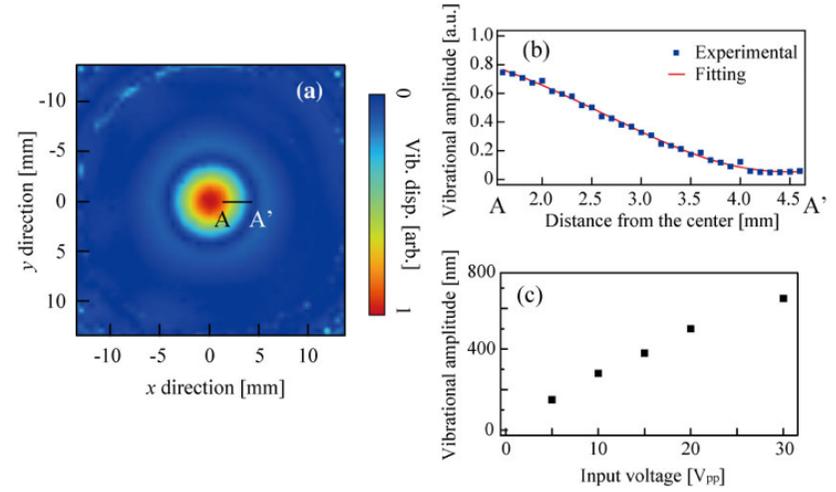


図2 ディッシュ底部の超音波振動分布

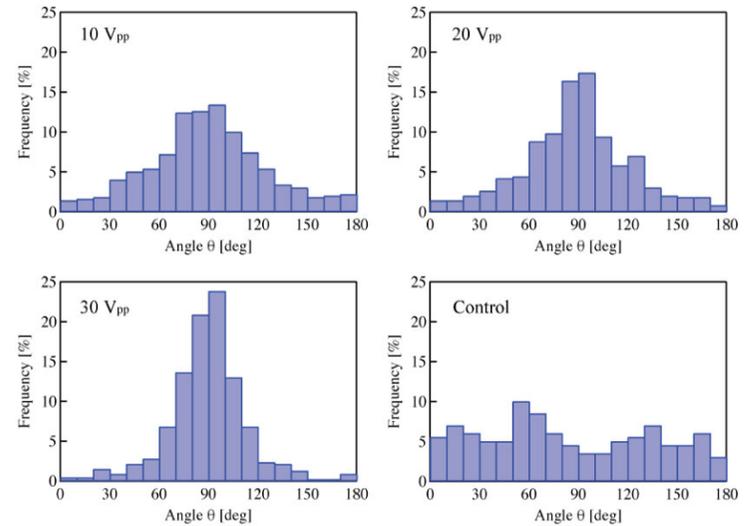


図4 入力信号の大きさと細胞配向の関係