

博士學位論文

氏名（本籍）	日野 遥（宮城県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	博甲第146号
学位授与年月日	平成 30年 3月 31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項
学位論文題目	培養細胞に対する機械的刺激の影響

論文審査委員	主査 教授 橋本 成広（工学院大学）
	副査 教授 鈴木 健司（工学院大学）
	〃 教授 伊藤 慎一郎（工学院大学）
	〃 教授 今村 保忠（工学院大学）
	〃 教授 藤江 裕道（首都大学東京）
	〃
	〃

目次

第1章 緒論	1
1.1 生体医工学.....	1
1.2 細胞バイオメカニクス.....	1
1.2.1 細胞.....	2
1.2.2 組織.....	2
1.2.3 細胞足場.....	2
1.2.4 培養表面の性質.....	3
1.2.5 マイクロ加工.....	4
1.3 機械的刺激.....	7
1.3.1 流れ刺激.....	7
1.3.2 超音波刺激.....	8
1.4 本研究の目的.....	9
参考文献	
第2章 細胞の配向に対する培養足場凹凸形状の影響	12
2.1 緒言.....	12
2.2 実験方法.....	13
2.2.1 微細加工表面の作製.....	13
2.2.2 細胞培養.....	15
2.2.3 評価方法.....	16
2.3 実験結果.....	17
2.4 考察.....	21
2.5 結言.....	24
参考文献	
第3章 細胞に対するせん断流れ刺激の影響	26
3.1 方向性を持つ細胞に対する流れ刺激の影響.....	26
3.1.1 緒言.....	26
3.1.2 実験方法.....	27
3.1.2.1 マイクロパターンを有する流路の作製.....	27
3.1.2.2 流路内における流れ.....	29
3.1.2.3 流れ刺激実験.....	30
3.1.2.4 評価方法.....	30
3.1.3 実験結果.....	31
3.1.4 考察.....	35

3.1.5 結 言.....	36
3.2 回転する円板を用いた流路における壁面せん断応力が培養細胞に及ぼす影響.....	36
3.2.1 緒 言.....	36
3.2.2 実験方法.....	37
3.2.2.1 せん断流れ刺激装置の作製.....	37
3.2.2.2 せん断流れ刺激実験.....	39
3.2.2.3 評価方法.....	40
3.2.3 実験結果.....	42
3.2.4 考 察.....	47
3.2.5 結 言.....	48

参考文献

第4章 細胞に対する超音波振動刺激の影響.....	53
4.1 緒 言.....	53
4.2 実験方法.....	54
4.2.1 実験装置の構成.....	54
4.2.2 超音波振動強度の測定.....	57
4.2.3 細胞培養.....	59
4.2.4 評価方法.....	60
4.3 実験結果.....	63
4.4 考 察.....	72
4.5 結 言.....	74

参考文献

第5章 結 論.....	77
---------------------	-----------

研究業績

謝辞

第1章 緒論

1.1 生体医工学

生体医工学 (Biomedical engineering : ME) は、医学に工学技術を取り入れて、生命現象を明らかにするとともに、診断や治療に有効な手段を提供する、新しい分野である (公益社団法人日本生体医工学会 HP). 医学や生物学の分野で工学の知識を活かすことを目的としている。また、生体医工学の範囲は広く、2017年の第56回日本生体医工学会大会では「MEは、なんでもできる！」と主張してさえいる。本項では主に橋本の解説¹⁾を参照して記述する。生体に対して工学的なアプローチをするという点では、力学や体育学から発展したバイオメカニクス、機械力学から発展したバイオメカニズム、流れ学から発展したバイオレオロジー、材料学から発展したバイオマテリアル、電子工学から発展したバイオエレクトロニクス、農学や生物学から発展したバイオテクノロジー等も生体医工学に含まれる。生体医工学のような境界分野では、複数の学問領域を跨いだ知識が必要となる。また、時として分野毎の専門的な用語が多種類の学問の理解の妨げになる。例えば、Controlという言葉は「制御、支配、管理」といった意味を持つが、生体に関連した分野では測定の基準値としての対象値を示すことが多い。本論文ではControlは後者の「基準値」としての意味で用いている。しかしながら、一つの分野の知識だけでなく、他分野での強みを活かすことは重要である。力学的な観点に立ち、生物試料に対する機械工学的なアプローチが重要であると考えられる。

1.2 細胞バイオメカニクス

細胞バイオメカニクスとは、細胞の形状の変化や自発的な変形、増殖、移動、分化、等の機能を力学的な側面で捉え、力学と細胞の応答の関係を理解する分野である。すなわち、広い生体医工学の分野において、対象を細胞に特化させた分野であるといえる。細胞は、外界からの刺激に対して応答を示すことが知られている。これまでに、様々な方法論が考案され、細胞の挙動を制御するための機械的な刺激や、細胞培養基板の形状に工夫がなされてきた。これらの細胞挙動の操作方法の開発による成果は再生医療の分野へと応用されている。再生医療の分野には、浮遊細胞を生体に注入して移植する手法と、生体内または生体外で構築した細胞組織を移植する手法がある。前者では、損傷部への細胞の導入の困難さや、損傷部から細胞が移動してしまうといった問題があり、後者では、生体外で組織構造を構築することが困難であるといった問題が存在する。その為、生体外及び生体内において組織を構築する手法として組織工学的手法が用いられている。組織工学 (Tissue engineering) とは、1993年に Langer, Vacanti により提唱された分野であり、工学や医学等の連携による複合分野である。このように、組織工学的な手法は生命医科学の知識のみでは成し得なかったが、近年の学問連携により、目覚ましい進歩を遂げている。更に、近年では、温度応答性培養皿 (Temperature-responsive culture dish) を用いてシート状の細胞組織を得るシート工学 (Cell sheet engineering) が誕生し、組織工学の更なる発展が期待できる。

1.2.1 細胞

細胞 (Cell) は全ての生物が持ち、生物体を構成する最小単位である。細胞には筋細胞 (Muscle cell)、骨細胞 (Osteocyte)、マクロファージ (Macrophage) などの免疫細胞、神経細胞 (Neuron) 等の様々な種類があり、複数の細胞が集まることで生物を構成している。ヒトの身体では約 1 kg につき 1 兆個の細胞が含まれている。細胞は細胞質 (Cytoplasm) または細胞体 (Cell body) と核 (Nucleus) とそれを取り囲む膜 (Cell membrane) で構成されており、細胞膜内外での物質のやり取り、つまり個々の細胞の代謝、分泌等の活動が、1 個体 (Individual) の生命を維持している。細胞質中には、小胞体、リボゾーム、水解小体、細糸等の構造物が含まれており、細糸 (Filament) として区分されるアクチン細糸 (Actin filaments)、微小細糸 (microfilaments)、中間径細糸 (Intermediate-sized filaments) は細胞質の中で 3 次元的な構造をとり、細胞全体の形状を支持する細胞骨格 (Cytoskeleton) となる。細胞質中の細胞骨格と膜の構造から、細胞はテンセグリティ (Tensegrity) と呼ばれる構造形式モデルに例えられる。

1.2.2 組織

細胞は、個体内において無秩序に配列しているのではなく、分化 (Differentiation) の方向を同じくする細胞が集まり、一定の規律に従って配列し、組織 (Tissue) を構成することで、一定の機能を有する^{1,2)}。組織には上皮組織・支持組織・筋組織・神経組織の 4 種が区別され、様々な組織が集まることで器官 (Organ) となる。更には、様々な器官が集まり、生物体としての体をなす。すなわち、生物体を理解するためには、細胞の有する機能や役割の理解が重要である。

1.2.3 細胞足場

接着性の細胞は、コラーゲンや結合組織あるいは培養皿等の基質に接着する。細胞は、接着たんぱく質を介して細胞外基質に接着しており、細胞底面全体ではなく、細胞底面に局在する接着点で接着している (焦点接着)。また、焦点接着を繋ぐようにアクチン細糸が結ばれ、細胞の形状の維持がなされている。細胞が接着する基質を足場 (Scaffold) と呼び、足場の形状を工夫することで、単一細胞の方向の制御や細胞組織への異方性の付与が可能となることが知られている。肝臓の実質細胞である肝細胞は、その機能から一列に並び、配列を持った構造を有することが知られている。腱や靭帯、筋等の構造もまた線維構造をしており、強い異方性を有していることから、生体外における細胞組織の方向制御は、再生医療の分野における組織作製、方向制御技術として重要であると言える。細胞や組織の方向に影響を与える微細な足場形状の加工には、後述するマイクロ加工技術を用いることができる。細胞の配向には、細胞の寸法よりも大きい、あるいは小さいラインアンドスペース形状のパターンが用いられる。図 1.1 に微細加工面と細胞の関係を例として示す。図 1.1 はテンパックスガラス製の基板に接着した細胞に固定処理を施し、走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning electron microscope) を用いて観察したものである。近年では、サブミクロンサイズのパターンに対しても、細胞が応答を示すことが報告されている^{5,6)}。しかし、由来部

位や動物によって細胞の寸法が異なることから、足場形状の寸法には検討の余地が存在し、足場と細胞挙動 (主として配向) については不明瞭な点が存在する。

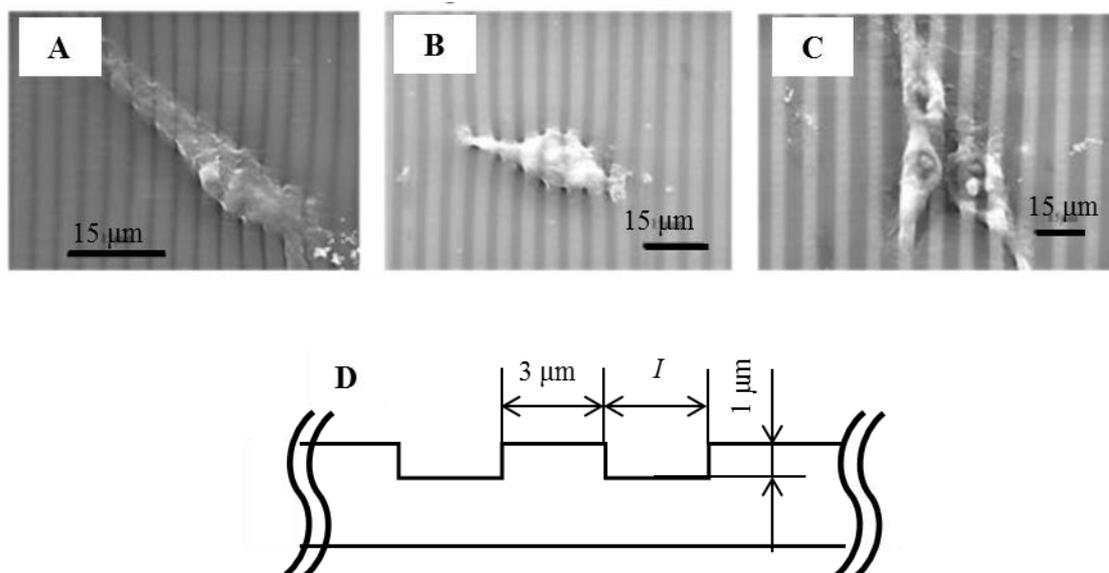


図 1.1 微細加工を施された細胞培養足場に接着する筋芽細胞 (C2C12) の SEM 観察画像。

$I = 1 \mu\text{m}$ (A). $I = 3 \mu\text{m}$ (B). $I = 5 \mu\text{m}$ (C).

1.2.4 培養表面の性質

細胞は培養基板 (培養基質, 培養足場) に接着することで増殖や分化, 遊走等の挙動を示し, 基質接着依存性を有することが知られている. 表面の改質方法として O_2 ガスを用いたアッシング処理が有る. アッシング処理をした表面には, OH や CO , COOH 等の官能基が生成され, 親水表面 (Hydrophilic surface) となる. 表面の性質 (ぬれ性) の評価方法として接触角 (Contact angle) の測定がある. 固体表面では, 表面張力が働くが, 表面の親水・疎水状態により表面張力の大きさは異なり, 付着した液体の形状も異なる. そのため, 表面に液体を付着させた時の固体表面と液体表面の成す角度から, 表面の状態を調べることができる. 接着性細胞に対しては, 親水表面は接着性を向上させるが, 逆に疎水表面では細胞の接着が抑制されることが知られている. しかし, 親水・疎水性が及ぼす細胞接着への効果は, 細胞接着面の硬さによっても変化することも知られている. 図 1.2 にアッシング処理を施し, 親水面となった基質を示す. 図中には, 純水と PDMS (Poly-di-methyl-siroxane) の接触角を示す.

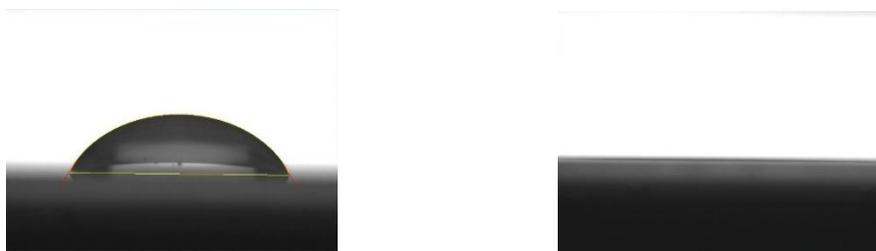


図 1.2 PDMS 上の超純水の接触角.

1.2.5 マイクロ加工

マイクロ加工には、主として半導体の加工に用いられている MEMS 技術 (Micro-Electro-Mechanical-Systems) が用いられる。細胞のサイズがマイクロメートルオーダーであることから、細胞の足場形状の加工には MEMS 技術が適している。本項は、主として江刺の解説³⁾を参照した記述を含む。培養表面上への微細な凹凸形状の作製には、フォトリソグラフィ技術が用いられている。フォトリソグラフィとは、Si ウェハなどの基板の上に感光性の材料 (フォトレジスト) を塗布し、光を用いてフォトマスクのパターン形状を一括転写するフォトファブ리케이션方法である。この工程を繰り返すことによって、基板上に多数の要素からなる複雑なシステムを作ることができる。図 1.3 はフォトリソグラフィの工程を示す。

マイクロメートルオーダーの加工を行う際、加工面の不純物が障害となる。そのため、空気中の微細なパーティクルを除いたクリーンルーム内での作業が必要となり、微細加工前に加工面に付着した不純物は除去する必要がある。不純物は、金属等のパーティクル、空気中の塵 ($0.5 \mu\text{m}$ 以下のサイズ)、残渣、有機物等の種類がある。不純物の除去方法には、 O_2 プラズマを用いたアッシング処理 (Ashing) や、枚葉式洗浄機を用いた洗浄、超音波を用いた有機洗浄等が挙げられる。フォトリソグラフィを実施するには、加工表面に液体のフォトレジストを塗布する必要がある。フォトレジストには、後述するエッチング工程の際、加工面以外を保護する役割がある。フォトレジストには紫外光に対する反応から、大きく分けてポジ・ネガ型の2種類ある (Positive, Negative)。ネガ型は露光された箇所が現像後に残り、逆にポジ型は露光部が除去される。フォトレジストの塗布には、吹付けやスピコートが用いられる。スピコートは、基材の回転により生じる遠心力を用いて、フォトレジストを薄く塗布することができる。スピコートによるレジスト膜の厚さは回転数に依存し、回転数に比例した薄いフォトレジスト膜を形成できる。フォトレジストと基材の接着性の向上を目的として、シランカップリング処理を施す場合がある。シランカップリング処理は、HMDS 処理とも呼ばれており、HMDS (Hexa-methyl-di-silazane) を表面にコーティングする。主に、ポジ型レジストを用いる場合に使用され、基材の表面を疎水化することができる。

基材との接触面積が小さいパターンニングを行う際には、HMDS 処理が大きく貢献し、図 1.4 に示すようなフォトマスクパターンの剥離を回避することができる。基材の表面に塗布したレジストの流動による膜厚の変化を避けるため、露光前に加熱処理を行い、レジストを硬化させる必要がある。加熱の温度や時間はフォトレジストの種類によって異なり、加熱はレジスト塗布直後だけでなく、露光後、現像後に行う場合もある。塗布されたフォトレジストにパターンを焼き付ける工程では、電子ビームやレーザー、マスクアライナ等の露光機を用いる。電子ビームやレーザーを用いた描画装置を用いる場合には、適切な露光条件にて図面通りのパターンを描画する。マスクアライナを用いた露光には、フォトマスクと呼ばれるパターンの原版を石英等の光透過性の良い基材に形成したマスクを用いる。前者は、パターン形状の変更が容易であるが、描画に時間を要する。後者は、露光時間が短いため、電子部品用の回路の作製等で同形状のパターンを大量に露光する場合に多く用いられる。フォトレジストの種類により、光反応に要する出力 (W) や波長 (nm) は異なる。光源には水銀灯による g 線 (波長 : 436 nm) や i 線 (波長 : 365 nm) あるいは、エキシマレーザー (波長 : 193 nm) が用いられている。露光したパターン形状の通りにフォトレジストを溶出させ、パターン形状を得るために現像の工程を行う。半導体・液晶等の作製で、ポジ型レジストを用いる場合には、TMAH (Tetra-methyl-ammonium-hydroxide) 系の現像液が広く用いられている。エッチング工程は、現像工程後に得られるパターンニングされたフォトレジストを有する基材表面を加工する工程である。エッチングには、化学薬品による腐食を利用した湿式の方法 (ウェットエッチング) と、反応ガスを用いる乾式の方法 (ドライエッチング) が存在し、フォトマスク底面を等方的にエッチングする等方性エッチング、Si 基材の結晶構造を利用した結晶異方性エッチング、直進性の高いガスを用いた異方性エッチングがある。異方性ドライエッチングは、イオンを電界で加速し基板表面に照射するイオンエッチングであり、基本的に基材を垂直にエッチングできる。特に F や Cl などの反応性イオンを照射する反応性イオンエッチング RIE (Reactive Ion Etching) を用いると、マスクに対する選択性が高く、また、高速にエッチングできる。エッチング工程後に、残存する基材上の不要なフォトレジストを除去する。不要なレジストの除去方法には、フォトレジストを気相中で分解・除去するアッシング処理や有機溶剤を用いて除去する方法がある。

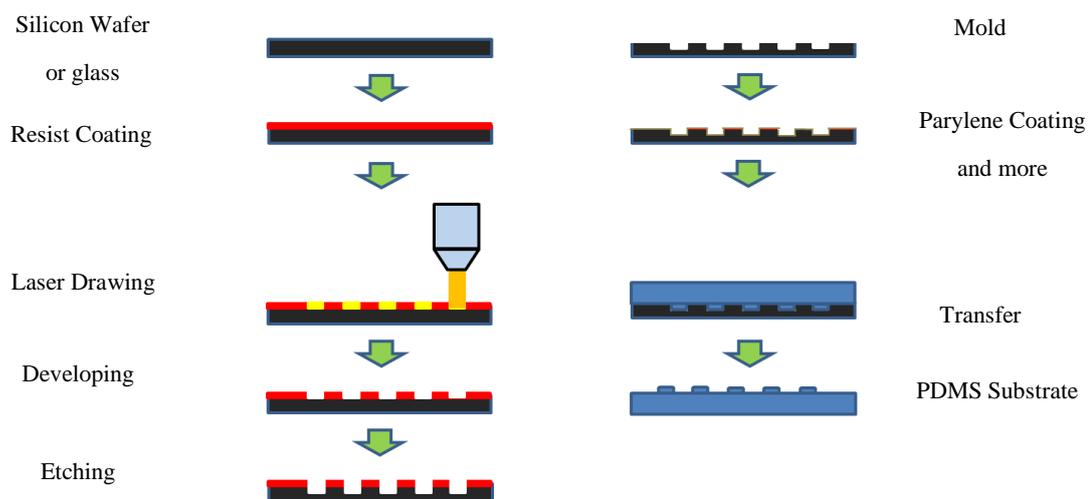


図 1.3 フォトリソグラフィの工程.

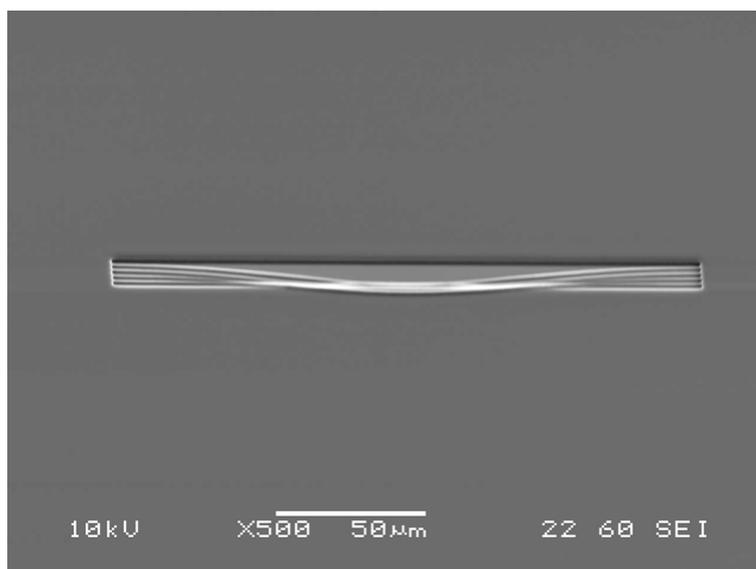


図 1.4 HMDS 処理をせずに作製したフォトマスク.

1.3 機械的刺激

生命の活動に伴い、生体内では機械的な力が細胞に負荷されている。例えば、血管内皮細胞は血流に常にさらされており、血管構成細胞である平滑筋細胞は、拍動による血管の拡大・縮小を受けて、絶えず変形を繰り返す。また、筋肉や骨の細胞は引張や圧縮が繰り返され負荷されていることは周知の事実である。実際、動脈硬化症における初期病変は血管内に発生しているせん断応力が小さい箇所に着目していることから、機械的な刺激と病気との間に関係性が有ることは明白であるが、逆にせん断応力の高い部位における血管内皮細胞の機能変化が原因であるという主張もあり、実際には機械的刺激との関係性については明白な答えが出ていない。このような血管における力学環境が原因で疾患が発生するという説は、血行力学説と呼ばれ、せん断応力が低いと都合が悪いという低せん断応力説、その逆の高せん断応力説が有る。また、血管病変を発生させる重要な要因として、血管の屈曲部などに発生する流れの方向が変化する部位でのせん断応力の変化等も指摘されており、流れの特徴と細胞の挙動には密接な関係が存在すると考えられ、機械的な刺激に対する応答の研究が重要であると言える。しかし、組織を対象として機械的刺激を負荷する実験では、せん断応力の負荷、流れによる組織の変形、変形に伴う細胞同士の牽引力の発生といったように、複雑な力学環境を考慮する必要があるが有り、機械的な刺激に対する応答を理解することは難しい。最近では、単一の細胞でも力学的な外環境を感知する機構が有ることが報告されており、単一の細胞の機械的な刺激に対する応答の検討は重要であり、組織と比較して条件を整えやすい点は有用であると言える。機械的な刺激は生体内のみで発生する以外に、生体外から負荷される場合も存在する。例えば、地球上に存在するだけでも、常に重力環境にさらされている。また、医療の発展に伴い、電気を用いた治療方法や磁力、放射線、超音波等の様々な刺激が生活に取り入れ、非生理的な機械的刺激を受ける機会は増えている。以上のことから、機械的に対する応答の検討が重要であることが伺える。

1.3.1 流れ刺激

流れ刺激は、血流を代表として生体内に発生している生理的な機械的刺激の一つである。血管内皮細胞だけでなく、骨組織に生じるひずみが組織液の流動を誘発し、組織液の流れによるせん断応力に細胞が応答を示すとする説も存在する。様々な細胞に対して定量的な流れ刺激を付加し、その時の応答を定量的に評価することで、新たな細胞操作技術の開発が期待できる。これまでに、せん断応力環境にさらされた血管内皮細胞は、流れの方向に配向することが知られ^{7,8)}、配向に至る機構や刺激の受容機構についても理解が成されてきた⁹⁾。しかし、せん断応力を血管構成細胞以外に適用した例は少ない。細胞に対して流れ刺激を負荷する方法として、流路内での細胞培養が挙げられる。近年では、微細加工技術が広く用いられており、毛細血管を模擬した流路内での細胞培養も行われている。この方法では、流路入口の圧力と出口の圧力の差によって流れを発生させ、流路に想定されるポアズイユ流れ (Poiseuille) 流れを利用する (図 1.5A)。Poiseuille 流れの式は、もともと血管内の血液の流れから提唱された。生体環境を模擬した生理的な機械的刺激のひとつである。細胞培養システムとして Poiseuille 流れを用いる場合、観察面が平坦であることが

好ましいことと、作製のしやすさから、2枚の平板の間を流れる流路がしばしば用いられる。図 1.5A に示すように、Poiseuille 流れにおける流速は、壁面で最小となり、管の中心で最大となり、流速分布は放物線形状となる。流路の幅は流路の高さ（平板間の距離）に対して十分に広い必要があり、算出されるせん断応力の計算では、流れが流路の入り口から観察位置までの距離で十分に発達している必要があることから、助走区間を含む設計である必要がある¹⁰⁾。一方、Poiseuille 流れを想定せず、Couette 流れ（図 1.5B）を想定して実験を行うシステムも報告されている。Poiseuille 流れでは、微細な流路内に発生している実際の流れを観測することは困難であり、Poiseuille 流れでは、放物線形状の速度分布となるという仮定のもとに計算が行われている。しかし、Couette 流れは、静止する面と動く面に挟まれた流体に発生する流れであり、図 1.5B に示す様に、流体の速度分布は静止面からの距離に比例する直線形状となるため、流路内の速度分布は Poiseuille 流れと比較して安定しやすい。Ando らの研究では、静止する細胞培養面と回転する円板を用いて Couette 流れを発生させる装置を作製し、細胞への流れ刺激を負荷している。Ando らの実験では、血管内皮細胞がせん断応力に対して配向したことを報告している¹¹⁾。

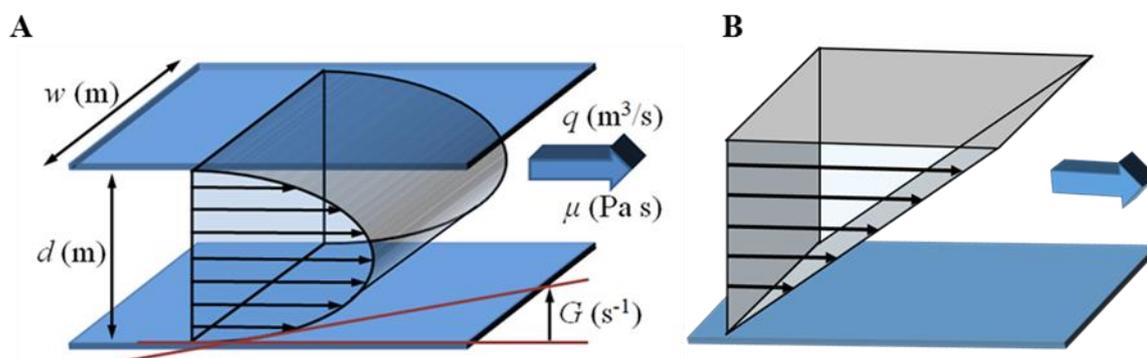


図 1.5 流速分布。平行平板間における Poiseuille 流れの流速分布 (A)。Couette 流れにおける流速分布 (B)。

1.3.2 超音波刺激

近年では、流れ刺激のような生理的な刺激にだけでなく、非生理的な刺激に対しても細胞が応答を示すことが知られている。その中の 1 つに超音波刺激がある。超音波とは、JIS 規格の定義によれば「可聴音の上限周波数（およそ 16kHz）を超える音響振動」とされている。工業の分野だけでなく医療の分野でも用いられており、脂肪や血管壁、腫瘍組織の音響インピーダンスの違いや、組織表面での反射を利用した診断が行われている。また、超音波のドップラ効果を利用した血流の表示や、がん診断、超音波検査（エコー）が行われている。医療での診断等に用いられていることから、超音波は人体に対して安全であると考えられており、米国超音波学会では、「低 MHz 領域においては、これまでに哺乳類動物組織に 100 mW/cm² 未満の強さの超音波を照射しても、有意

な生体反応を見たという報告は無い」と発表している。しかし、高いエネルギーの超音波環境では、魚が死に、胆石の破壊等にも用いられていることから、人体に対しても影響を及ぼすことは明白である。人体に与える影響の原因として超音波振動による発熱や、短時間での流体中の圧力差による気泡の発生（キャビテーション）が挙げられる。これまでに、力学的な刺激に対する細胞応答の研究が行われ、最近では、微細振動のような非生理的な刺激に対しても細胞が応答を示すことが知られている。生体に及ぼす超音波刺激の影響の調査だけでなく、階層を下げた細胞レベルでの応答を検討することで、生命に対する危険性の新たな知見を得ることだけでなく、新たな細胞操作技術の開発が期待できる。超音波振動の発生方式として、断続的に超音波を発生させる Low-Intensity Pulsed Ultra Sonic (LIPUS, 低強度パルス超音波振動) や継続的に振動を伝える Low-Intensity Ultra Sonic (LIUS, 低強度超音波振動) がある。LIPUS と細胞の応答に関する研究では、*in vitro* における細胞への影響が調査され^{12,13)}、LIPUS を用いた骨髄間質細胞の石灰化促進に対する定量評価¹⁴⁾ や細胞の活性の増加¹⁵⁾ が調査されてきた。また、筋細胞に対する影響も調査されており LIPUS は筋芽細胞の増殖を促進させるだけでなく、分化をも促進するという報告¹⁶⁾ がなされている。LIUS と細胞の応答に関する研究では筋細胞に対する影響が調査され、LIUS が筋芽細胞の増殖を促進させることを示した¹⁷⁾。このように、非生理的な機械的刺激が細胞に与える影響が調査されており、非生理的な機械的刺激もまた生理的な力学刺激同様に細胞の Mechanotransduction と直接関係することを示している。また類似の研究として 1 kHz の超音波よりも周波数が低い領域の微細振動が及ぼす細胞への影響を調査した研究がなされており、微細振動は細胞の接着や形状に影響を与えることが報告され、更に、微細振動は培養液に含まれる分化誘導因子に働きかけることで神経細胞の分化促進を及ぼすという報告もなされている^{18,19)}。このように幅のある周波数領域における培養細胞への影響が調査され、細胞の代謝、増殖や分化に影響を与えることが明らかとなってきている。

1.4 本研究の目的

細胞が集まることで組織を成し、単体の細胞ではなく、組織として発現する機能を調査するためには、2次元の配列を模擬、あるいは3次元構造を模擬することで、はじめて生体外での機能の評価が可能となる。しかし、本論文では3次元の構造に対する議論は行わず、単一細胞あるいは2次元の層構造をなす細胞について論じる。何故なら、組織の移植や3次元構造の細胞組織の構築等が可能になってもなお、単一の細胞の機能や足場、機械的な刺激に対する応答については不明な部分が多く存在しており、組織としての機能を解明するためには、最小単位である単一細胞の足場形状・機械的刺激に対する応答について理解する必要があるからである。また、3次元構造の組織では、力学刺激を負荷した際に組織の形状変化が起こる。組織の変形は細胞同士の牽引等を引き起こし、純粋な細胞の機械的刺激に対する応答を調査することはできない。単一の細胞が有する特徴や機能、足場構造や機械的刺激に対する応答を理解することで、再生医療へ向けた *in vitro* での組織作製が可能であると考えられる。本論文では、細胞の形状の変化や配列、単一細胞の方向に対し、細胞培養足場形状・機械的刺激が与える影響について研究を行った。

参考文献

1. 橋本成広, 生体システム工学入門, 東京電機大学出版, 1996.
2. 山本敏行, 基準組織学 (改訂第12版), 株式会社南江堂, 1989.
3. 江刺正喜, はじめての MEMS, 森北出版株式会社, 2011.
4. 筏義人, 再生医工学—基盤技術の確立と臨床応用をめざして, 株式会社化学同人, 2001.
5. S.J. Liliensiek, J.A. Wood, J. Yong, R. Auerbach and P.F. Nealey, “Modulation of human vascular endothelial cell behaviors by nanotopographic cues”, *Biomaterials*, Vol.31, No.20, 2010, pp.5418-5426.
6. J.H-C. Wang, F. Jia, T.W. Gilbert and S.L-Y. Woo, “Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix”, *Journal of Biomechanics*, Vol.36, No.1, 2003, pp.97-102.
7. T.J. Flaherty, E.J. Pierce, J.V. Ferrans, J.D. Patel, K.W. Tucker and L.D. Fry, “Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events”, *Circulation Research*, Vol.30, No.1, 1972, pp.23-33.
8. N. Kataoka, S. Ujita and M. Sato, “Effect of flow direction on the morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells”, *Medical & Biological Engineering & Computing*, Vol.36, No.1, 1998, pp.122-128.
9. P.F. Davies and S.C. Tripathi, “Mechanical stress mechanism and the cell-an endothelial paradigm”, *Circulation Research*, Vol.72, No.2, 1993, pp.239-245.
10. E. Martines, K. Mcghee, C. Wilkinson and A. Curtis, “A parallel-plate flow chamber to study initial cell adhesion on a nanofeatured surface”, *IEEE Transaction on NanoBioscience*, Vol.3, No.2, 2004, pp.90-95.
11. J. Ando, H. Nomura and A. Kamiya, “The Effect of Fluid Shear Stress on the Migration and Proliferation of Cultured Endothelial Cells”, *MICROVASCULAR RESERCH*, Vol.33, No.1, 1987, pp.62-70.
12. K. Sena, S.R. Angle, A. Kanaji, C. Aher, D.G. Karwo, D.R. Sumner and A.S. Viridi, “Low-intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) and Cell-to-cell Communication in Bone Marrow Stromal Cells”, *Ultrasonics*, Vol.51, No.5, 2011, pp. 639-644.
13. A. Suzuki, T. Takayama, N. Suzuki, M. Sato, T. Fukuda and K. Ito, “Daily Low-intensity Pulsed Ultrasound-mediated Osteogenic Differentiation in Rat Osteoblasts”, *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Vol.41, No.2, 2009, pp.108-115.
14. S.R. Angle, K. Sena, D.R. Sumner and A.S. Viridi, “Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells by Various Intensities of Low-intensity Pulsed Ultrasound”, *Ultrasonics*, Vol.51, No.3, 2011, pp.281-288.
15. T. Takayama, N. Suzuki, K. Ikeda, T. Shimada, A. Suzuki, M. Maeno, K. Otsuka and K. Ito, “Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/2.8 cells”, *Life Science*, Vol.80, Issue10, 2007, pp.965-971.
16. K. Ikeda, T. Takayama, N. Suzuki, K. Shimada, K. Otsuka and K. Ito, “Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells”, *Life Science*, Vol.79, Issue20, 2006, pp.1936-1943.
17. H. Park, M.C. Yip, B. Chertok, J. Kost, J.B. Kobler, R. Langer and S.M. Zeitels, “Indirect Low-Intensity Ultrasonic Stimulation for Tissue Engineering”, *Journal of Tissue Engineering*, Vol. 2010, 2010, Article

ID 973530, 9 pages.

18. Y. Ito, T. Kimura, Y. Ago, K. Nam, K. Hiraku, K. Miyazaki, T. Masuzawa and A. Kishida, “Nano-vibration effect on cell adhesion and its shape”, *Bio-medical Materials and Engineering*, Vol.21, No.3, 2011, pp.149-158.
19. Y. Ito, T. Kimura, K. Nam, A. Katoh, T. Masuzawa and A. Kishida, “Effect of Vibration on Differentiation of Cultured PC12 Cells”, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.108, No.3, 2010, pp.592-599.

第2章

細胞の配向に対する培養足場凹凸形状の影響^{1,2)}

2.1 緒言

現在、再生医療の分野において、機能構造を持つ細胞組織の作製や細胞挙動の制御に向けた研究が盛んに行われている。これらの研究によりもたらされる機能的細胞組織の作製技術は、人体の損傷した部位への移植に向けた生体内の組織に近い細胞組織の作製や難病に対する治療法開発の研究試料作製に繋がり、更なる発展と新技術の開発が切望されている^{3,4)}。生体組織を模擬した細胞組織を作製するにあたり、細胞の形状や方向の制御などといった複数の課題がある。これらの課題は、異方性のあるパターンが施された足場を用いて培養を行うことで、実現に向かっており、先行研究では、パターン形状と細胞の配向との関係性を報告している⁵⁻⁸⁾。更には、筋繊維に異方性を付与し、1方向に収縮する筋組織の構築や構造を付与した心筋シートの作製等、生体内構造様の組織が作製されている^{3,4)}。しかし、生体内の組織に近い細胞組織を *in vitro* で作製するには、組織レベルの大きい制御のみでは不十分であり、単一の細胞の持つ幅や長さの制御が必要であると考えられる。臓器や筋肉などの運動組織を構成する最小単位は細胞であり、単一の細胞の幅や長さの制御はより緻密な組織の作製のために重要であると言える。また、生体内の組織では、複数種類の細胞が混在しているが、マイクロパターンを有するスキャフォールドを用いた細胞の挙動の調査では1種類の細胞を対象としている場合が多く、他種細胞間で同条件下の比較が困難となっている。以上のことから様々な種類の単一細胞の長さを調節し、整った機械部品のように細胞組織を整然と構築することで、より生体に近い組織の作製につながると考えた。そこで、本研究では凹凸形状を有する足場を作製し、筋芽細胞、繊維芽細胞、血管内皮細胞、神経細胞の細胞形状に与えるパターンの影響を評価することを目的とした。凹凸形状の高さによって変化する細胞の配向性を調査するため、高さの異なる凹凸形状の足場を作製した。また、凹凸形状の間隔が及ぼす細胞の長さへの影響を調査するため、間隔の異なる3種類のパターンを作製した。作製した基板上における細胞の様子を経時的に観察し、凹凸形状に対する細胞の角度は、画像解析ソフトウェア Image-J を用いて解析し、細胞の配向を定量的に評価し、凹凸形状の高さ、間隔が及ぼす細胞への影響について検討した。

2.2 実験方法

フォトリソグラフィ技術を用いてモールド (鋳型) を作製し, その形状を PDMS に転写することで, 高さの異なる培養足場凹凸形状 (マイクロパターン) を作製した. マイクロパターンは, 図 2.1 のようなラインアンドスペース形状をしており, 寸法はそれぞれ, 線の幅 W : $3\ \mu\text{m}$, 間隔 I : $7\ \mu\text{m}$, 長さ L : $2\ \text{mm}$ とした. 培養基板は, モールド形状を転写して作製するため, 足場形状は凸構造を有する. 凸構造の高さ H は $0.3, 0.7, 1.5, 2.5, 3.5\ \mu\text{m}$ とした. 作製したマイクロパターンはレーザ顕微鏡で測定を行った. 1-10 本の平行に並ぶ微細な凸構造 (Micro ridge) 上で細胞の培養を行い, 細胞の挙動は画像解析を行うことで定量的に評価した. また, 凹凸形状同士の間隔が細胞形状に与える影響を調査するために, 線の幅 W を変化させた基板を用意した. 寸法はそれぞれ, 凸部の高さ H : $1\ \mu\text{m}$, 線の幅 W : $1, 3, 5\ \mu\text{m}$, 間隔 I : $3\ \mu\text{m}$, 長さ L : $500\ \mu\text{m}$ とした. それぞれ幅の異なるマイクロパターンは $500 \times 500\ \mu\text{m}$ の範囲に作製し, $W = 0, 1, 3, 5\ \mu\text{m}$ の4種類の微細加工面を並べることで, $1 \times 1\ \text{mm}$ の範囲に作製した. この時, 幅 $W = 0\ \mu\text{m}$ はパターンを設けない平坦な面とし, 比較対象とした.

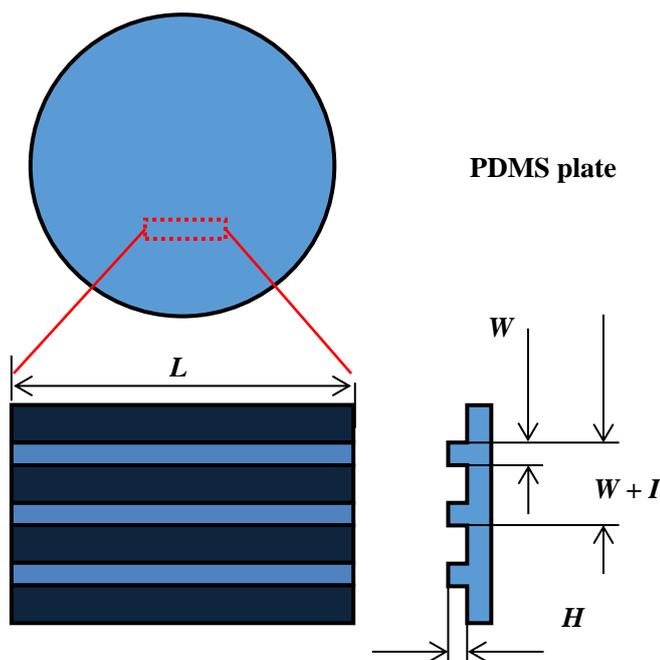


図 2.1 PDMS 基板上の凹凸形状.

2.2.1 微細加工表面の作製

高さ H の異なるマイクロパターンの作製¹⁾

高さの異なる足場凹凸形状を有するモールドの基材には Si ウェハ (P 型シリコンウェハ, 松崎製作所) を用いた. Si ウェハには直径 $50\ \text{mm}$, 厚さ $0.3\ \text{mm}$ のものを使用した. Si ウェハを下記の

工程で洗浄した。Si ウェハ表面をエッチング装置 (FA-1, サムコインターナショナル) を用いて O_2 イオンで5分間アッシング処理し、微細な塵や残渣を除去した。超音波洗浄機を用いて、イソプロピルアルコール (IPA)、過酸化水素中 (H_2O_2)、超純水に浸漬させた Si ウェハをそれぞれ5分間洗浄し、ホットプレートを用いて $100^\circ C$ で5分間乾燥させた。Si ウェハには、スピンドライヤを用いてフォトレジスト (OFPR-800, 東京応化工業) を本速 5000 rpm の条件で $2\ \mu m$ 厚になるように塗布し、 $100^\circ C$ のオーブンで1分30秒間プリバークして硬化させた。足場凹凸形状をレーザ直接描画装置 (波長: 408 nm, 出力: 20 mW) を用いて描画し、オーブンを用いて5分間 PEB (Post Exposure Bake) した。その後、現像液 (NMD-3, 東京応化工業) を用いて、90秒間現像し、超純水を用いてリンスし、接着性を向上させるために $100^\circ C$ で5分間焼き締め、エッチング装置 (RIE-10NR, サムコ) を用いて、マイクロパターンが描画されたフォトマスクを有する Si ウェハの除去加工を行った。この時、反応ガスには C_4F_8 と SF_8 を使い、ガスを切り替えながら除去加工を行った。Si ウェハの表面から不要なレジスト剤を除去するため、 O_2 ガスを用いて5分間アッシング処理した (50 W, 30 ml/min)。その後、PDMS からの剥離を容易にするため、Si ウェハ表面をパリレンコーティング装置 (PDS-2010, Specialty coating systems) を用いて $1\ \mu m$ 厚でコーティングした。パリレンをコーティングした Si の縁をポリイミドテープで囲い、主剤と硬化剤を 10 : 1 で混合させた PDMS を流し込み、真空デシケータで脱気した後にオーブンで焼き固めることで ($100^\circ C$, 1時間)、円柱状の基板を得た。

細胞培養を行う際、PDMS 基板表面の親水性が細胞の接着に影響を与える為、培養直前にアッシング処理を行い、超純水を用いて表面を保護することで均一な親水性を確保した。接触角計 (Phenix300, メイワフォーシス株式会社) を用いて表面の親水性を計測した。

幅 W の異なるマイクロパターンの作製²⁾

モールドの基材には $\phi 50 mm$ の Si ウェハを使用した。スピンドライヤを用いてウェハ表面の塵や残渣を除去した。幅が小さいマイクロパターンの作製には、Si ウェハとレジスト剤の接着性を高める必要があったため、レジスト剤を塗布する前に、スピンドライヤを用いて HMDS (Hexamethyldisilazan) を本速 3000 rpm で塗布し、ウェハ表面を HMDS 処理した。その後、フォトレジストには OFPR-800LB を使い、本速 7000 rpm で厚さが $1.7\ \mu m$ になるように塗布し、 $100^\circ C$ のホットプレートで30秒間プリバークした。レーザ直接描画装置を用いてパターンの形状を描画し、 $100^\circ C$ のホットプレートで5分間 PEB した。NMD-3 を用いて現像し、超純水を用いた置換処理後、スピンドライヤを用いて乾燥させた。Si ウェハのエッチングには RIE を用いた。プロセスガスには SF_6 , Ar を使い、深さが $1\ \mu m$ となるように、30分間除去加工した。加工後、残存するレジストを除去するためにアッシング処理を行った ($100 W$, 5分)。作製したモールドの形状は形状測定マイクロスコープを用い、溝を横断する方向に測定した。作製した PDMS 上の構造は、SEM を用いて観察した。PDMS に凹凸形状を転写するため、パリレンコーティングを行ったモールドに、ポリイミドテープで側面に壁を作製し、PDMS を流し込んだ。この時の PDMS と硬化剤の混合比は 10:1 とした。脱気後、オーブンを用いて $100^\circ C$ で硬化させた。

2.2.2 細胞培養

高さ H の異なる凹凸形状に対する細胞の応答について検討するため、培養容器にはオートクレーブ滅菌した PDMS 基板を 6 ウェルプレートに設置したものを用いた (図 2.2A)。このとき、ウェルの直径が 35 mm のため、PDMS 基板を $\phi 35$ mm になるように切り抜いた。培養開始まで基板表面の親水性を保つため、表面の超純水を 10%FBS (Fatal bovine serum) を含む DMEM 培地 (Dulbecco's modified Eagle's medium) と置換した。実験にはマウス横紋筋由来筋芽細胞 (C2C12, DS ファーマバイオメディカル株式会社) を用いた。

幅 W の異なる凹凸形状に対する細胞の応答について検討するため、外径 50 mm、内径 33 mm、厚さ 5.5 mm の PDMS 製の壁を、凹凸を有する PDMS 基板上に設置し、マイクロパターン構造を有する面を培養底面として使用した (図 2.2B)。実験には、筋芽細胞 (C2C12), 脂肪前駆細胞 (3T3-L1, DS ファーマバイオメディカル株式会社), 肝ガン細胞 (Hepa1-6, DS ファーマバイオメディカル株式会社), 線維芽細胞 (L929, DS ファーマバイオメディカル株式会社) の 4 種類の細胞を実験に用いた。継代数が 3-8 の細胞を用いた。C2C12, 3T3-L1, Hepa1-6 の培養には、上記の高さ H の異なる凹凸形状に対する細胞の応答についての検討時と同様に FBS を 10% 含む DMEM 培地を使用し、L929 の培養には FBS を 10% 含む EMEM 培地 (Eagle's minimal essential medium) を用いた。

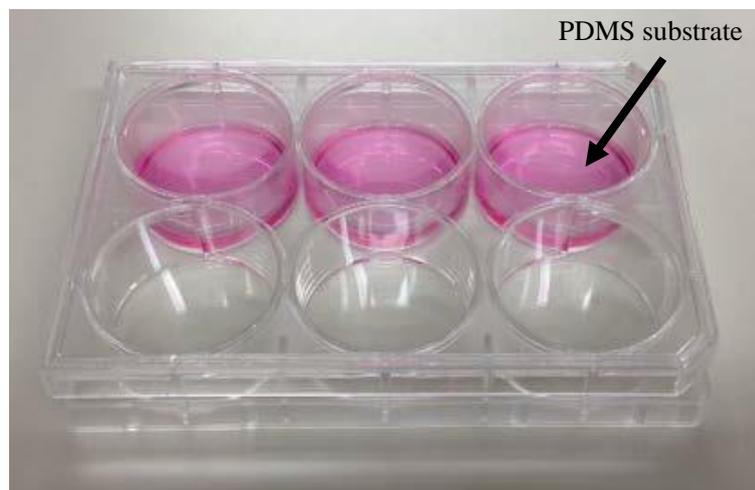


図 2.2A 足場凹凸形状を有する基板及び培養容器 (6 ウェルプレート).

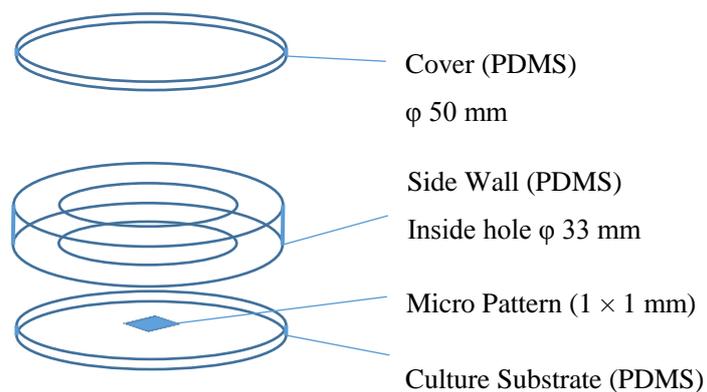


図 2.2B 足場凹凸形状を有する基板及び PDMS リング。

2.2.3 評価方法

細胞の足場凹凸形状に対する配向挙動を評価するため、汎用画像処理ソフトウェア (Image-J, NIH) を用い、細胞の長軸方向とマイクロパターンの走行方向とのなす角を測定した。解析ソフト内の角度ツールを用いて細胞の長軸を測定し、パターンとの角度を調べた (図 2.3)。

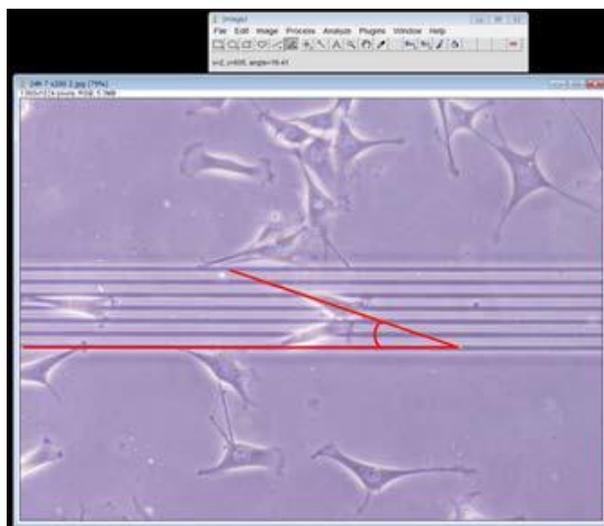


図 2.3 画像解析時の様子。

2.3 実験結果

作製したモールドの凹凸形状の測定結果を例として図 2.4, に示す. 図 2.4A に, $0.7\ \mu\text{m}$ の溝構造のレーザ観察像を示す. 幅, 高さが $1.5\ \mu\text{m}$, $0.7\ \mu\text{m}$ ほどの凹型形状の構造が作製できていることがわかる. 図 2.4B は幅 W を変化させた基板の SEM 観察画像を示す. 同一基板上に幅の異なる凹凸形状を作製できた. 図 2.5 は低倍率での測定結果を示す. 同一の深さを有する凹凸形状が繰り返し作製できていることがわかった. 細胞培養面の性質について調査するため, PDMS 表面と DMEM 培地による接触角を測定した. 図 2.6 に測定時の画像を示す. 図 2.6A は, O_2 プラズマによるアッシング処理前の PDMS 上での接触角を示し, 図 2.6B は, 処理後の画像を示す. 処理前の DMEM 培地の液滴の有する接触角と比較して処理後の接触角が減少し, アッシング処理により表面が親水化処理されたことがわかった.

次に, PDMS 上のマイクロパターン近辺における細胞の様子を示す (図 2.7). 細胞は 7 日間培養した. また, 図 2.7 では画像の左端から右端までの長さが $0.5\ \text{mm}$ となっている. 図 2.7A は $H = 0.3\ \mu\text{m}$ の凹凸上に接着した細胞の様子を示す. マイクロパターン上と平坦な基板表面に接着した細胞は, ほぼ同一の形状を示しており, $0.3\ \mu\text{m}$ の凹凸構造では細胞の形状や方向に影響を与えず, ラインアンドスペースの溝を跨ぐように接着できることがわかった. 図 2.8 は, $H = 0.7, 3.5\ \mu\text{m}$ のマイクロパターン上に接着した細胞の様子を示す. 図 2.8 は, 播種後 6 時間後における 1 本の凸形状に隣接した細胞の様子を示す. $H = 0.7\ \mu\text{m}$ の凸上に接着した細胞は, マイクロパターンの走行方向に対して平行な方向に仮足を伸展させ, 接着直後の細胞の方向に影響を与えることがわかった. また, 図 2.8 は, 播種後 3 時間後におけるパターン上に接着した細胞の様子を示す. $H = 3.5\ \mu\text{m}$ のパターン上では, 細胞が凸部に接着し, 伸展方向はパターンの走行方向に伸展し, 円に近い形状でも仮足の方向に影響を与えることがわかった. 図 2.8B は培養 2 日後における $H = 3.5\ \mu\text{m}$, $I = 7\ \mu\text{m}$ のパターン上の細胞の様子を示す. $0.3\ \mu\text{m}$ よりも高い凸部を有するパターン上の細胞は, 凹部に細胞体が入り込み, 仮足をパターンの凹部走行方向に伸展させている様子が観察できた. また, 図 2.9 はマイクロパターンの末端部近傍に位置する細胞の様子を示す. 細胞は仮足を伸展させ, 凹部に仮足を侵入させている様子が観察できた.

図 2.11 に凸部の高さ毎に, パターンと細胞の長軸方向が成す角度の分布を示す. 角度が減少する順番に並べ, 凸部の高さ毎にマーカの形状を変えて表示した. 図 2.11 では, プロットが成す線の傾きが小さくなる場合, その角度の細胞数が多いことを示し, 傾きが小さくなる場合は, その角度の細胞数が少ないことを意味する. $H = 3.5\ \mu\text{m}$ のパターン上では, 全ての細胞が 0° に存在しており, パターンの走行方向を向くことがわかる. また, パターンの走行方向に配向を示す傾向は, 凸部の高さ H が高くなるのに比例して大きくなり, $H = 1.5, 2.5, 3.5\ \mu\text{m}$ のパターン上では大部分の細胞の角度が 45° よりも低くなった. 図 2.12 は縦軸に細胞の角度, 横軸に H を示す (Mean \pm S.D.). 図 2.10 での結果同様に, H の増加に伴い細胞の方向が 0° 方向に近づくことがわかり, $H = 0.3\ \mu\text{m}$ の凹凸上では細胞角度の平均値が 40° - 60° 周辺に集まり, パターンの方向に従わないことが分かった. パターンの幅 W の異なるパターン上に接着し, 変形する様子が観察できた.

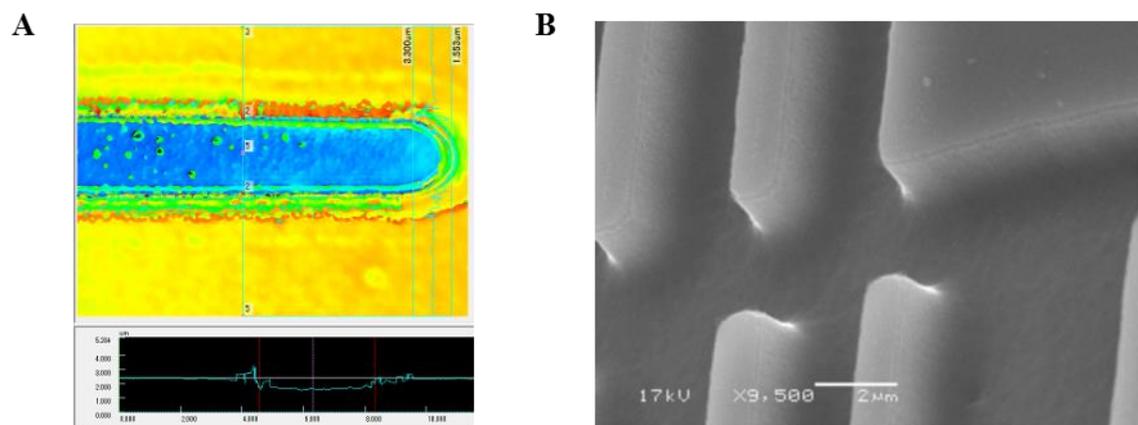


図 2.4 作製した足場凹凸形状. 高さ H を変化させた基板のレーザ測定画像 (A), 幅 W を変化させた基板の SEM 画像 (B).

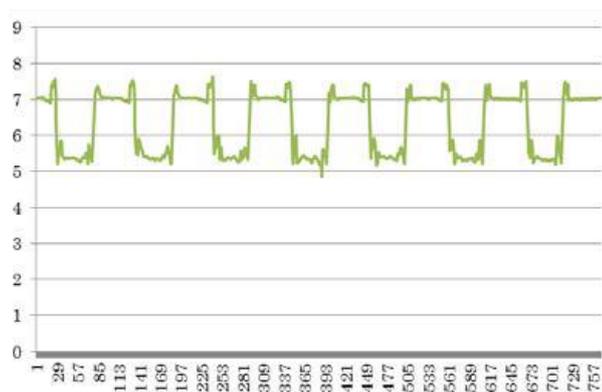


図 2.5 マイクロパターンの配列.

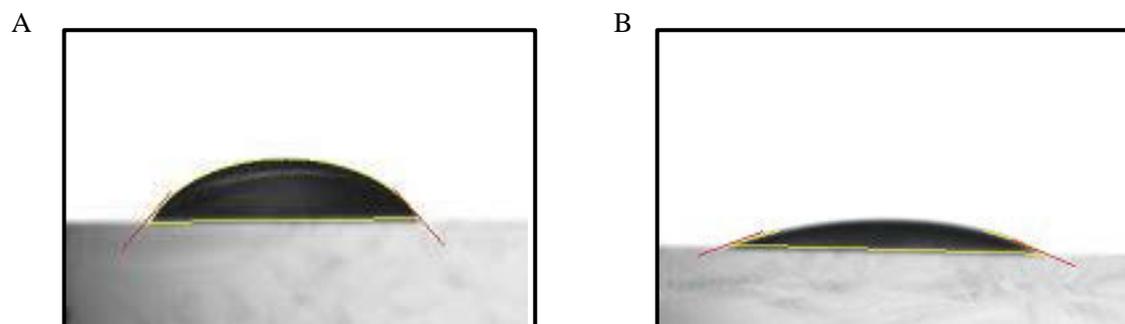


図 2.6 接触角測定時の PDMS 表面と DMEM 培地の接触角. アッシング処理前 (A), 処理後 (B).

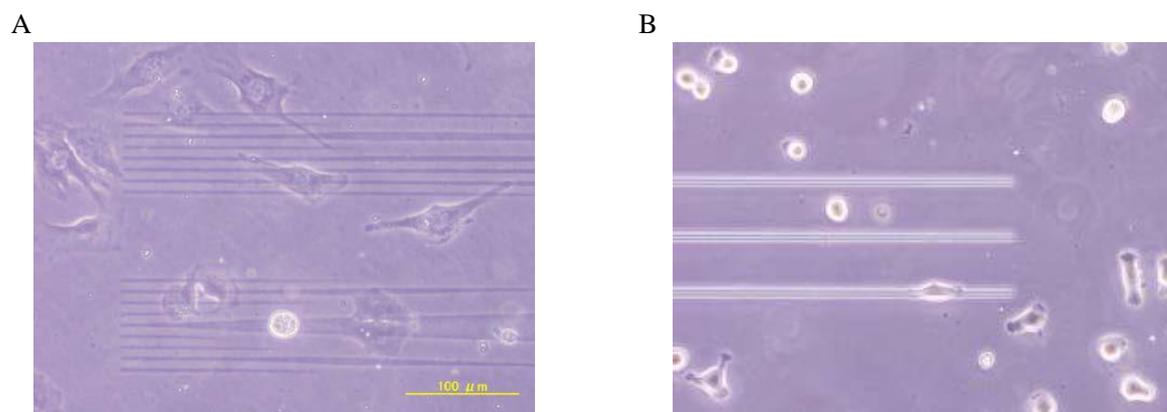


図 2.7 高さ 0.3 μm (A), 0.7 μm (B) のマイクロパターン上の細胞の様子.

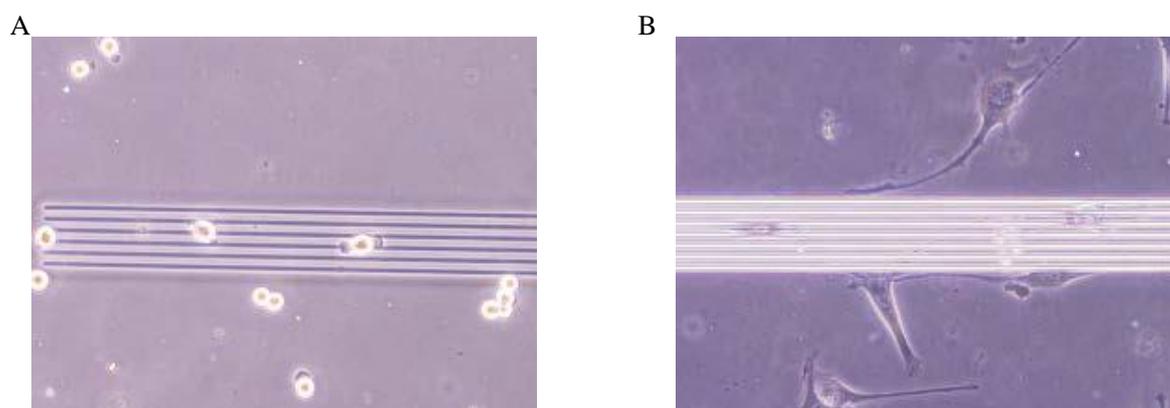


図 2.8 高さ 0.7 μm (A), 2.5 μm (B) のパターン上の細胞.

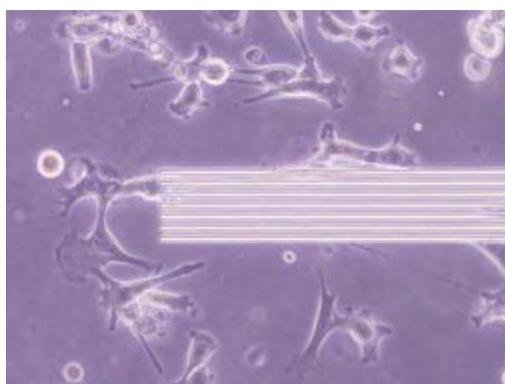


図 2.9 マイクロパターンの末端部に位置する細胞の様子.

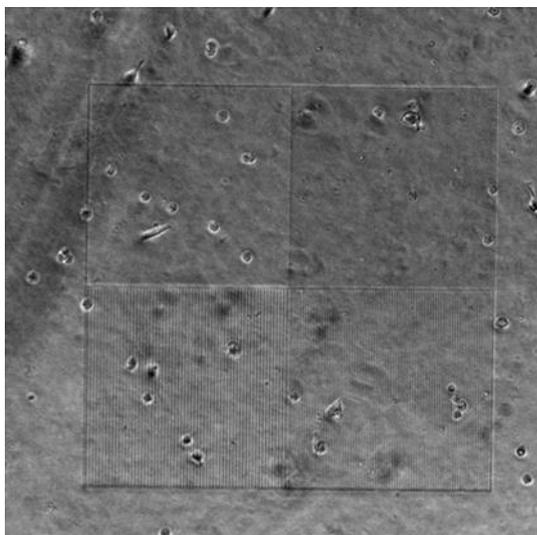


図 2.10 幅の異なるパターン上の 3T3-L1 の様子 (播種後 3 時間).

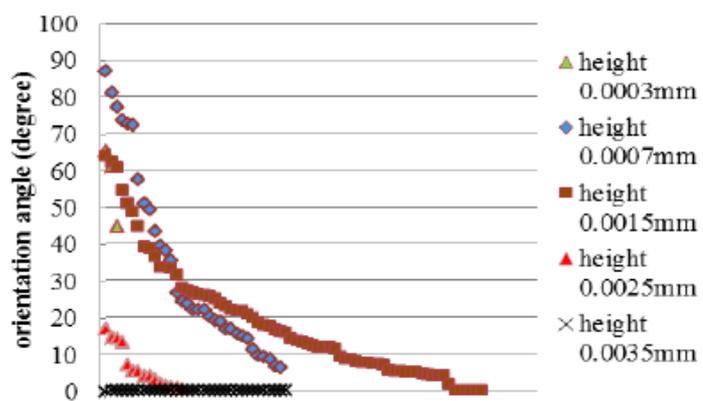


図 2.11 パターンの高さ毎の細胞の角度分布.

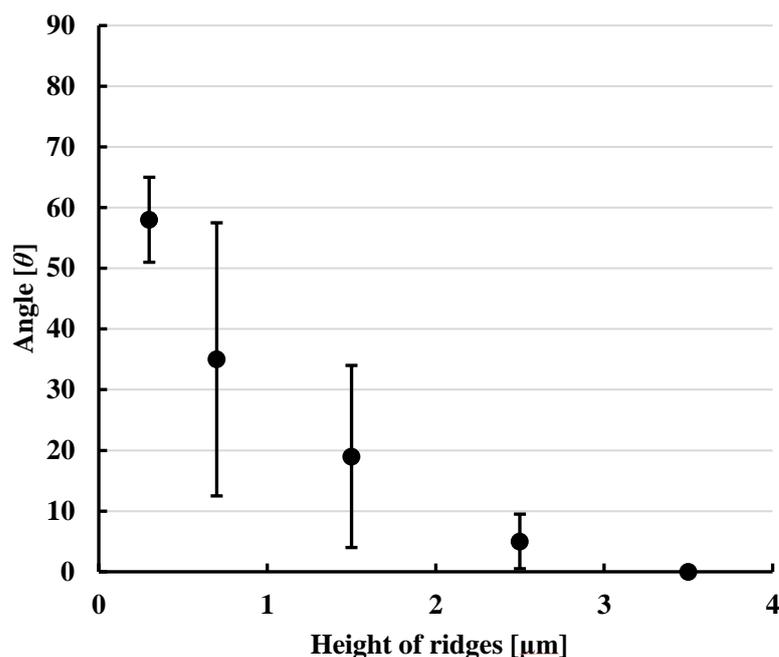


図 2.12 パターンの高さ毎の細胞の角度分布.

2.4 考察

本研究では、細胞培養表面の凹凸 (マイクロパターン) の高さが細胞の配向に与える影響を調査するため、高さの異なるマイクロパターンを有する培養基板上で筋芽細胞 (C2C12) 培養を行い、パターンの方向と細胞の長手方向との成す角の測定を行った。細胞の配向とパターンの高さは比例関係に有り、パターンの高さが増すほどに配向を示す細胞の数は増加する傾向であった。最も高さの大きい $3.5 \mu\text{m}$ のマイクロパターン上の細胞は角度が 0° となり、基板形状による強い制約を受けていると考えられた。Uttayarat らの実験では、マイクロパターン上で細胞を培養し、細胞の様子は SEM を用いて観察した。SEM による観察像から、細胞はマイクロパターン上や溝だけではなく、パターンの壁面にも接着していることを報告している¹⁰⁾。また、マイクロメートルからミリメートルオーダーの様々な寸法形状を有するパターンで壁に接着する細胞の挙動が報告されている¹¹⁻¹⁵⁾。本研究での $3.5 \mu\text{m}$ のパターン上における細胞の強い配向は、パターンの高さが大きく、パターンの溝部に伸展した細胞仮足が壁に接着することができたためであると考えられる。一方、 $0.3 \mu\text{m}$ のマイクロパターン上では配向を示す細胞が観察できなかった。このことから、細胞が配向を示すための高さ H に閾値があると考えられる。 $2.5 \mu\text{m}$ のパターンに隣接して位置する細胞がパターンの壁面に沿う様に変形していることから (図 2.8B)、細胞が足場の凹凸形状が $2.5 \mu\text{m}$ よりも高い場合、段差を避けるように遊走挙動を示し、細胞の配向に影響を与えていると考えられる。隣接する細胞を避けて広い空間に増殖や移動を繰り返す性質 (接触阻止挙動) は、古くから知られている。本研究で観察できた基板上の凸形状近傍で細胞がパターンに沿う応答は、筋芽細胞が $2.5 \mu\text{m}$ よりも高さの大きい凸形状を壁面と認識し、避ける様に伸展をした結果であると考えら

れる。しかし、細胞の角度の結果 (図 2.11, 12)では、高さ H が $0.7\ \mu\text{m}$ のパターン上の細胞の角度は 30° 以下に分布しており、比較的、高さの小さいパターン上の細胞も配向挙動を示す傾向を示したことから、細胞の配向に与えるパターンの高さの影響には、細胞の接着する位置が関係していると推測できる。すなわち、本実験で用いたマイクロパターンの間隔を変化させた場合、細胞の配向する程度に影響がある。図 2.7B に示す間隔の大きく、細胞が1つの凸部にのみ接着をした場合には、細胞がパターン方向に平行に伸展している。このことから、凸部に接着している細胞は、他の凸部が隣接している場合 (図 2.14A)、凸部同士を跨ぐ様に接着することができるため、細胞の長手方向とパターン方向の成す角度が大きくなる。他方、他の凸部が隣接していない場合 (図 2.14B)、パターン方向外に伸展することができず、細胞の角度が小さくなり、細胞の配向に与える影響が大きいと考えられる。細胞が凸部に接着、あるいは隣接する必要があるため、細胞の寸法を考慮し、パターン同士の間隔の詳細な検討する必要があると言える。しかし、細胞は隣接する細胞の方向に沿うように伸展する性質を有しているため、細胞の密度が変化することで、細胞の角度分布に影響が見られると推測できる。その為、細胞の密度についても検討を行うことで、*in vitro* で異方性を有する細胞組織の作製技術の向上につながると考えられる。

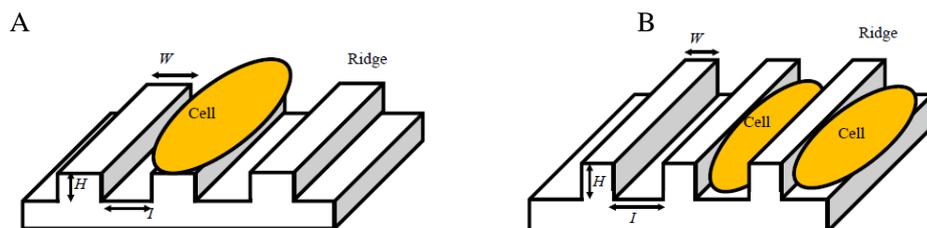


図 2.13 高さの異なるパターン上での細胞の配向。

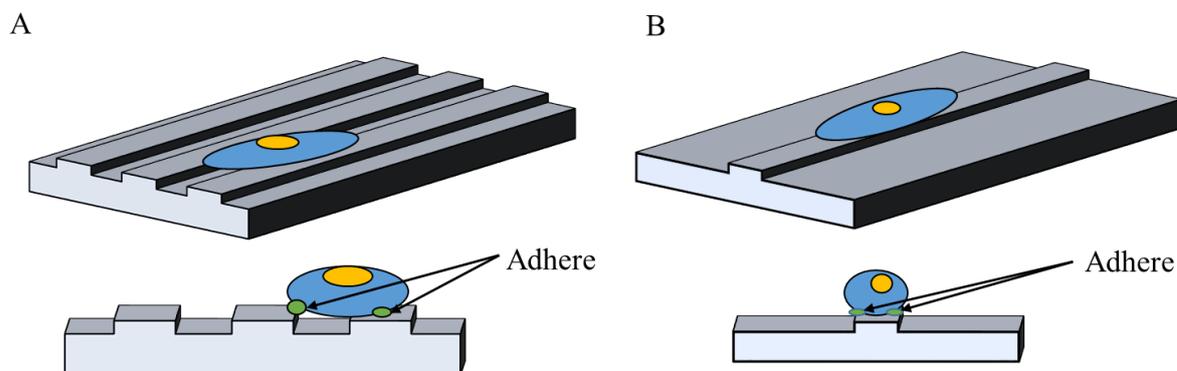


図 2.14 培養足場凹凸形状に接着する細胞。複数のパターンに接着した細胞 (A)、単一のパターンに接着した細胞 (B)。

培養面の性質は細胞の挙動に影響を与えることが知られている²⁰。特に表面の濡れ性は細胞の培養に重要であり、細胞の接着に影響を与える。そのため、本研究における細胞の配向は微細加工凹凸上の濡れ性の影響を受けている可能性が考えられる。そのため、凹凸の存在が表面の性質に影響を与えると仮定し、接触角を用いてパターン上の濡れ性についての評価を行ったところ、パターン上の濡れ性に異方性が存在することが確認できた(図 2.15)。このとき、 O_2 プラズマを用いた表面改質は行わず、PDMS 基板上に滴下した 5 μ l の超純水を、パターンの正面、側方から観察した。図 2.15A は、未加工面およびパターンの正面からの観察像を示しており、未加工面上の水滴よりも加工面の水滴の方が球に近い形状をしていることがわかる。また、B は微細加工面上の水滴をパターンの側方から観察した像を示す。水滴の形状は左右に広がっていることがわかる。このことから、足場の形状だけでなく濡れ性の異方性も、細胞の配向方向に影響を与える可能性があり、今後の検討が必要である。本実験では、細胞培養直前に O_2 プラズマを用いた表面の改質を行うことで、表面の性質を超親水状態に整えた。そのため、細胞の配向に及ぼす影響を、足場形状の寸法で評価できたと考えられる。

本研究では、細胞組織の培養の前段階として単一の細胞の配向に着目した。しかし、図 2.7-9 のパターン近辺の細胞同士が相互に接着した場合は、細胞の牽引力を及ぼし合うために細胞の角度は変化する。そのため、組織培養の為には、細胞の密度を増加させた試料を作製し、複数の細胞が互いに牽引力を及ぼす環境で、配向応答を示す閾値について検討をする必要があると考えられる。

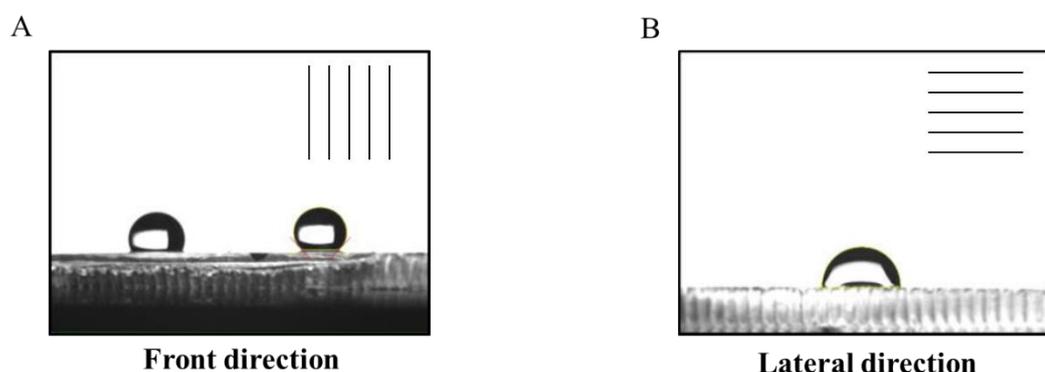


図 2.15 パターン上の接触角。パターン方向から撮影した水滴の形状 (A)、微細加工無し (A 左)、微細加工表面上 (A 右)。パターンの側方から撮影した水滴の形状 (B)。

2.5 結言

培養細胞の配向に対する培養足場凹凸形状の影響を調査するために、PDMS製の基板の上に高さ及び幅の異なるラインアンドスペース形状のマイクロパターンを作製した。1.5 μm 、2.5 μm の微細構造上では、筋芽細胞は微細構造の凸部に接着しマイクロパターンの走行方向に伸展した。高さ0.3 μm のパターン上の細胞は、パターン形状の影響を受けず、高さ0.7 μm のパターン上の細胞は凹凸形状の影響を受けて配向を示したことから、0.3、0.7 μm の間に、細胞の配向方向を制御するための足場の凹凸の高さの閾値が有ることを見出した。また、幅の異なるマイクロパターンは複数種類の細胞の形状に影響を与え、その影響は細胞の種類によって異なることが分かった。

参考文献

1. H. Hino, S. Hashimoto and F. Sato, "Effect of Micro Ridges on Orientation of Cultured Cell", *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol.12, No.3, 2014, pp.47-53.
2. H. Hino, S. Hashimoto, S. Nishino and H. Nakajima, Y. Takahashi and H. Sugimoto, "Behavior of Cell on Vibrating Micro Ridges" *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol.13, No.3, 2015, pp.9-16.
3. K. Shimizu, H. Fujita and E. Nagamori, "Micropatterning of single myotube on a thermoresponsive culture surface using elastic stencil membranes for single-cell analysis", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol.109, No.2, 2010, pp.174-178.
4. T. Shimizu, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano, "Cell Sheet Engineering for Myocardial Tissue Reconstruction", *Biomaterials*, Vol.24, No.13, 2003, pp.2309-2316.
5. P. Bajaj, B. Reddy Jr, L. Millet, C. Wei, P. Zorlutuna, G. Bao and R. Bashir, "Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts", *Integrative Biology*, Vol.3, 2011, pp.897-909.
6. 27. D.D. Carlo, L.Y. Wu and L.P. Lee, "Dynamic single cell culture array", *Lab on Chip*, Vol.6, 2006, pp. 1445-1449.
7. S.J. Guo, T. Jian and D.J. Dong, "Cell orientation on a stripe-micropatterned surface", *Biomedical Materials*, Vol.54, No.18, 2009, pp.3154-3159.
8. J.C.H. Wang, F. Jia, T.W. Gilbert and S.Y.L. Woo, "Cell orientation determines the alignment of cell-produced collagenous matrix", *Journal of Biomechanics*, Vol.37, 2002, pp.97-102.
9. M.T. Lam, S. Sim, X. Zhu and S. Takayama, "The effect of continuous wavy micropatterns on silicone substrates on the alignment of skeletal muscle myoblasts and myotubes", *Biomaterials*, Vol.27, 2006, pp.4340-4347.
10. P. Uttayarat, G.K. Toworfe, F. Dietrich, P.I. Lelkes and R.J. Composto, "Topographic Guidance of Endothelial Cells on Silicone Surfaces with Micro- to Nanogrooves: Orientation of Actin Filaments and Focal Adhesions", *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.75, No.3, 2005, pp.668-680.
11. E.T. den Braber, J.E. de Ruijter, H.T.J. Smits, L.A. Ginsel, A.F. von Recum and J.A. Jansen,

- “Quantitative Analysis of Cell Proliferation and Orientation on Substrata with Uniform Parallel Surface Micro-grooves”, *Biomaterials*, Vol.17, No.11, 1996, pp.1093-1099.
12. P. Bajaj, B. Reddy Jr, L. Millet, C. Wei, P. Zorlutuna, G. Bao and R. Bashir, “Patterning the Differentiation of C2C12 Skeletal Myoblasts”, *Integrative Biology*, Vol.3, No.9, 2011, pp.897-909.
 13. R.H.W. Lam, Y. Sun, W. Chen and J. Fu, “Elastomeric Microposts Integrated into Microfluidics for Flow- Mediated Endothelial Mechanotransduction Analysis”, *Lab on Chip*, Vol.12, No.10, 2012, pp. 1865-1873.
 14. J.G. Sun, J. Tang and J.D. Ding, “Cell Orientation on a Stripe-Micropatterned Surface”, *Chinese Science Bulletin*, Vol.54, No.18, 2009, pp.3154-3159.
 15. A.I. Teixeira, G.A. Abrams, P.J. Bertics, C.J. Murphy and P.F. Nealey, “Epithelial Contact Guidance on Well-Defined Micro- and Nanostructured Substrates”, *Journal of Cell Science*, Vol.116, 2003, pp. 1881-1892.
 16. S. Hashimoto, F. Sato, R. Uemura and A. Nakajima, “Effect of Pulsatile Electric Field on Cultured Muscle Cells in Vitro”, *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol.10, No.1, 2012, pp. 1-6.
 17. S. Hashimoto and K. Tachibana, “Effect of Magnetic Field on Adhesion of Muscle Cells to Culture Plate”, *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol.11, No.4, 2013, pp.7-12.

第3章

細胞に対するせん断流れ刺激の影響^{1,2)}

3.1 方向性を持つ細胞に対する流れ刺激の影響¹⁾

3.1.1 緒言

細胞の培養技術は進歩し、様々な方法で細胞を培養することが可能となった。骨格筋細胞は機械部品では実現できていない柔軟、軽量、高効率なエネルギー変換器として、アクチュエータへの応用が期待されており、最近では、心筋細胞の代替細胞として、心不全に対する再生医療への応用が期待されている³⁾。筋組織を作製するにあたり、骨格筋の外界からの刺激や、足場に対する挙動についての詳細な理解が必要となる。細胞応答に関する研究では、細胞の足場や機械的的刺激に対する細胞の応答が研究されており、足場形状や機械的的刺激が細胞の機能発現や形状の制御に重要な役割が有ることが知られている^{4,5,6)}。特に、機械的的刺激は細胞の分化調節に影響を与え、繰返伸展刺激を負荷した細胞は *myogenic gene* の発現量が増加するという報告もある⁷⁾。最近では、培養表面の足場形状や機械的的刺激を複合させた手法についても検討がなされている。足場と機械的的刺激を組み合わせた条件における筋芽細胞の挙動の調査として、ラインアンドスペース形状のパターンを施した弾性膜上の細胞に対して繰返し伸展を負荷した報告がある^{3,8)}。Ahmed らの実験では、パターンと繰返し伸展を同時に行うと、筋芽細胞のパターンに対する形態的応答が、刺激の有無によって異なることを示している。このように、複数の外的要因を細胞に負荷することで、新しい知見が得られている⁴⁾。しかし、繰返伸展刺激を負荷したときの細胞の変形から力を推定する必要があり、刺激中の細胞の様子は確認できないという問題が存在する。一方、細胞の力学応答の研究では、流体によるせん断応力が利用されており、血管内皮細胞などの血管構成細胞の配向方向に影響を与えることが知られている^{9,10)}。接着たんぱく質を介さずに負荷可能な力学刺激であるため、細胞の力学応答の研究に有効な手段であると考えられる。そこで、せん断流れ刺激をマイクロパターン上で配向させた筋芽細胞の培養に適応させることで、定量的な機械的刺激環境で配向する組織の作製および、機械的刺激負荷時の細胞の観察が可能であると考えた。従来、せん断流れに対する応答は、血管構成細胞に対して研究され、骨格筋細胞などの多様な細胞に対して行った報告は見当たらないのが現状である。

本研究では、生体外での筋組織の作製の前段階として、単一の筋芽細胞の培養を行った。具体的には、ストライプ形状の微細加工面を有する流路で筋芽細胞 (C2C12) を培養し、流れ方向に対して 0°, 45°, 90° 方向に配向させた C2C12 に対して 1-3 Pa の流れ刺激を負荷した。定量的せん断流れ刺激環境における細胞の応答を評価した。

3.1.2 実験方法

3.1.2.1 マイクロパターンを有する流路の作製

本研究で用いた流路は、微細加工表面 (パターン) を有するガラスと PDMS (poly-di-methyl-siroxane) を組み合わせて作製した (図 3.1.1 A, B). 培養面のガラス基板には、流路の方向に対して角度の異なる 3 種類のラインアンドスペース構造のパターンを作製した (図 3.1.2). 本研究では、細胞をあらかじめ配向させる目的で、マイクロパターンを用いる。先行研究¹¹⁻¹⁵⁾と同様の形状を用い、パターンの寸法は溝部に細胞全体が入り込まず、パターンの上に接着するように、深さを $1\ \mu\text{m}$ 、凸部の幅およびパターン同士の間隔を $3\ \mu\text{m}$ とし、細胞よりも小さい寸法とした。図 3.1.2B に作製したパターン形状を示す。パターンの作製にはフォトリソグラフィ技術を用い、培養面のガラスには円板形状のガラス ($\phi 50\ \text{mm}$ テンパックスガラス, 千葉理化ガラス) を使用した。ガラス表面の前処理として、エッチング装置 (FA-1, サムコ株式会社) を用いて、プロセスガス O_2 , ガス流量 $20\ \text{ml/min}$, プロセス圧力 $< 10^{-1}\ \text{Pa}$, 出力 $100\ \text{W}$, 時間 10 分の条件でアッシング処理し、スピコート (IH-DX2, MIKASA) を用いて HMDS (1,1,1,3,3,3-ヘキサメチルジシラサン, 東京応化工業株式会社) を回転数 $3000\ \text{rpm}$, 時間 30 秒の条件で塗布することで、ガラス表面を疎水化処理した。ポジ型レジスト (OFPR-800LB, 東京応化工業株式会社) は回転数 $3000\ \text{rpm}$, 時間 20 秒の条件で塗布し、ホットプレートを用いて温度 100°C , 時間 90 秒の条件でプリベークした。パターン形状は、レーザー直接描画装置 (DDB-201K-KH, ネオアーク株式会社) を用い、描画速度 $0.1\ \text{mm/sec}$, 電圧 $3.05\ \text{V}$, フォーカスオフセット値 0.5 の条件で露光し、ホットプレートを用いて温度 120°C , 時間 180 秒の条件でポストベークした。その後、現像液 (NMD-3, 東京応化工業株式会社) を用いて 120 秒間現像した。ガラス表面の凹凸の作製には、エッチング装置 (RIE-10NR, サムコ株式会社) を用い、プロセスガス CF_4 , 流量 $30\ \text{ml/min}$, プロセス圧力 $2\ \text{Pa}$, 出力 $100\ \text{W}$, 時間 30 分の条件でエッチングした。エッチング後に残存したレジストは、FA-1 を用いて、プロセスガス O_2 , ガス流量 $20\ \text{ml/min}$, プロセス圧力 $< 10^{-1}\ \text{Pa}$, 出力 $100\ \text{W}$, 時間 10 分の条件で除去した。パターンを有する基板は、実験毎に作製して実験に用いた。作製したパターン形状は、形状測定レーザーマイクロスコプ (VK-X200, 株式会社キーエンス) 及び、走査型電子顕微鏡 (JSM-6360LA, 日本電子株式会社) を用いて観察、測定を行った。各パターンの測定点は 0° , 45° , 90° で無作為に 3 箇所測定し、パターンの寸法 (mean \pm S.D.) は、深さが $1.07 \pm 0.19\ \mu\text{m}$, 溝幅が $3.00 \pm 0.40\ \mu\text{m}$, 溝同士の間隔が $2.87 \pm 0.43\ \mu\text{m}$ のパターンが作製できたことを確認している。流路の形状は、流路長 $30\ \text{mm}$, 流路幅 $4\ \text{mm}$, 高さ $0.1\ \text{mm}$ の凹型形状になるように、アルミニウム製の金型を用いて、PDMS (SYLGARD 184 SILICONE ELASTOMER KIT, 東レ・ダウコーニング株式会社) に転写した。流路の両端には内径 $4\ \text{mm}$, 外径 $6\ \text{mm}$ のシリコンチューブを接続した。PDMS とテンパックスガラスは FA-1 を用いて (Thangawng et al., 2007), プロセスガス O_2 , ガス流量 $20\ \text{ml/min}$, プロセス圧力 $< 10^{-1}\ \text{Pa}$, 出力: $50\ \text{W}$, 30 秒の条件でアッシング処理をすることで接着した。PDMS とガラスの接着時における、超純水とガラス表面の接触角は、接触角計 (Phenix300, メイワフォース株式会社) を用いて測定した (3.1.3)。アッシング処理前の接触角は、 $58.11 \pm 1.69^\circ$ (mean \pm S.D., $n = 14$), アッシング処理後は、接触角が測定できず、超親水状態となった。

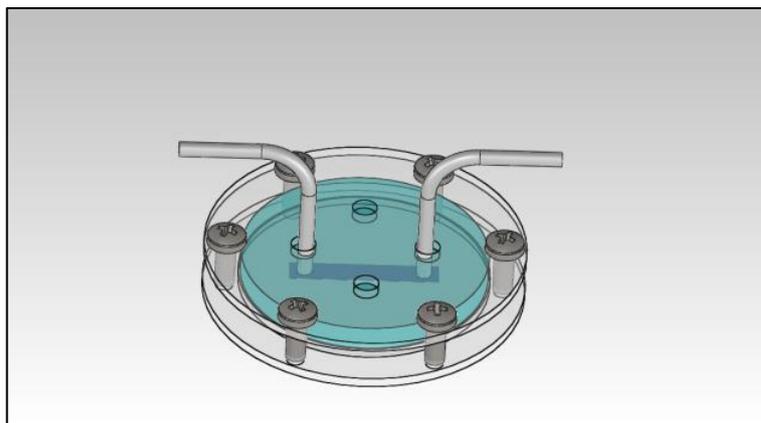


図 3.1.1A 流路の全体像.

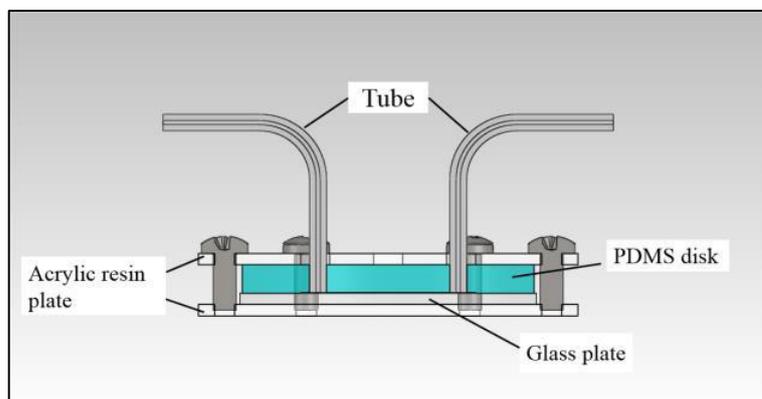


図 3.1.1B 流路の断面.

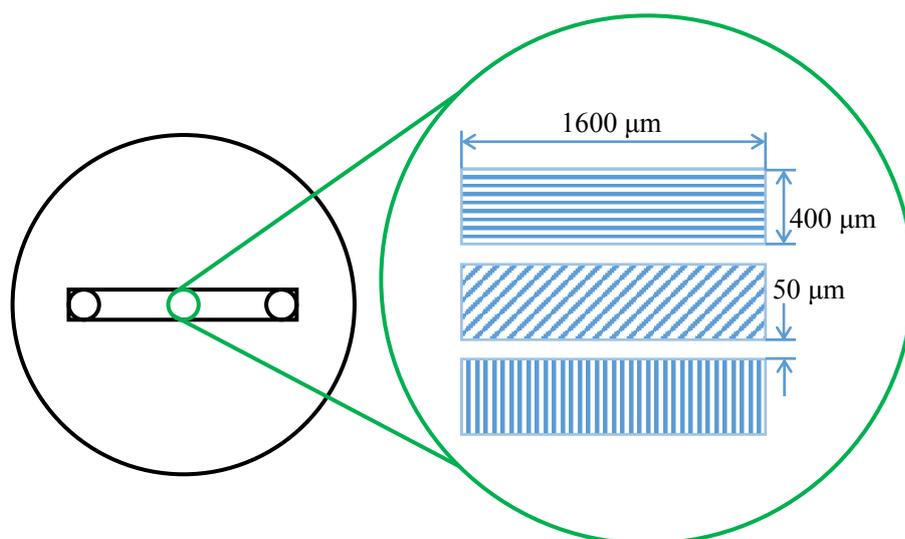
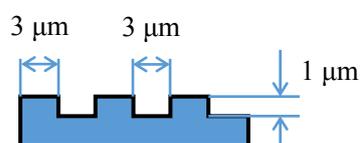


図 3.1.2A 微細加工面の形状.



Measurement

Height : 3 μm

Width : 3 μm

Interval : 3 μm

図 3.1.2B 微細加工面の寸法.



図 3.1.3 テンパックスガラス表面の接触角.

3.1.2.2 流路内における流れ

流路内の流れは、作製した流路とシリンジポンプ (CFX-1020P, 株式会社アイシス) を接続して発生させた。平行平板間の Poiseuille 流れに近似するために、流路の幅を高さの 40 倍とした¹⁷⁾。助走区間を十分にとって流れを安定にするために、流路の入り口から細胞観察面までの距離を 14 mm とした。細胞培養面に発生する壁面せん断応力値は、式 (1) を適用して計算した¹⁰⁾。

$$\tau = \frac{6\mu Q}{bh^2} \tag{1}$$

ここで、 τ はせん断応力 [Pa], Q は流量 [m³/s], b は流路の幅 [m], h は流路の高さ [m], μ は培養液の粘度 [Pa s] である。 $b = 4 \times 10^{-3}$ m, $h = 0.1 \times 10^{-3}$ m, 培養液の粘度として、粘度計 (バイオレオリザ, 東京計器) を用いて実測した値 0.002 Pa s を計算に用いた。

3.1.2.3 流れ刺激実験

流れ刺激実験には、継代数が 10 までのマウス横紋筋由来株化細胞 (C2C12, DS ファーマバイオメディカル株式会社) を用いた。流路内に濃度が約 0.5×10^5 cells/ml の細胞懸濁液を流し込み、鉗子を用いて培養液が静止した状態を保ち、インキュベータ内で 2 時間静置して接着させた。培養にはウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum, Sigma-Aldrich) を 10%, 抗生物質 (Penicillin-Streptomycin (100,000 U/mL), Thermo Fisher Scientific) を 1% 含む DMEM 培地 (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco) を用いた。本実験では 1.0, 2.0, 3.0 Pa のせん断応力の流れ刺激を細胞に負荷した。倒立位相差顕微鏡 (IX-71, オリンパス株式会社) ステージ上に設置した顕微鏡用 CO₂ 培養装置 (MI-IBC, オリンパス株式会社) 内の環境 (37°C, CO₂ 5%, 湿度約 100%) で実施した。このとき、小型インキュベータと培養液の入った瓶に 5% CO₂ を吹き込むことで、培養液の pH を安定させた。本実験では 2 時間の静置直後を 0 分とし、480 分間実験を行った。このとき、刺激時および刺激後の挙動について検討を行うため、実験開始から 240 分間は刺激を負荷した状態で観察を行い、残りの 240 分間は流れを止め、刺激後の挙動を観察した。流路内の圧力を調節するために、流路システムの高さの調節は重要である。実験時に気泡の流路内への混入を避けるためにシリンジポンプ、流路、リザーバ等の流路システムの高さを調節した。

3.1.2.4 評価方法

流れ刺激負荷時の細胞挙動はタイムラプス撮影を用いて 5 分毎に 1 枚の間隔で撮影した。タイムラプスにより取得した画像から、汎用画像解析ソフトウェア (Image-J, NIH) を用いて、細胞の二次元の輪郭形状を取得し解析した。本実験では、各条件で独立して行った 2 回の実験で取得した画像を解析した。細胞の配向を評価するため、細胞の輪郭形状を楕円に近似した時の、パターン方向に対する長軸の角度 θ [°] を測定し、形状を評価するために長軸長さ [μm], 短軸長さ [μm] をそれぞれ取得した。細胞の角度は 0° と 180° を同一の角度とし、0-90° で表記した。パターン上の細胞の移動挙動の評価のため、細胞の重心座標を伸展している細胞の位置と定義し、30 分毎の重心座標を取得した。細胞の形状を評価するため、細胞の長軸長 (L_{major}) と短軸長 (L_{minor}) の比 (*Shape Index*) を式 (3) を用いて計算した。

$$Shape\ Index = 1 - \frac{L_{minor}}{L_{major}} \quad (3)$$

Shape Index は 0 から 1 の間をとり、0 に近いほど円に近く、1 に近いほど細長い形状であることを示す。

3.1.3 実験結果

図 3.1.3 に基板上の各微細溝の SEM 観察画像を示す。また、形状測定マイクロスコープを用いて、パターン寸法の深さ = 1 μm 、幅 = 3 μm 、間隔 = 3 μm となっていることを確認した。C2C12 は 2 時間で培養基板に十分に接着し、配向する様子が観察できた。流れ刺激環境では、細胞がマイクロパターンの尾根に接着しており、1 Pa の条件では、4 時間の流れ刺激で細胞の配向が保持され、3 Pa の条件では、4 時間の流れ刺激で半分以上の細胞がマイクロパターンから剥離し、細胞の配向に変化が見られた (図 3.1.5)。図 3.1.6~図 3.1.8 にパターン上の細胞の軌跡を示す。図 3.1.6~図 3.1.8 に、例として細胞 10 個分の軌跡を示す。図中のプロットは細胞の重心位置を示し、30 分毎に図示した。また、図中の破線はパターンの方向を示している。1 Pa の条件では、パターンの方向と軌跡が平行に並んだことに対し、3 Pa の条件では、細胞の軌道がパターンの方向から逸れるように変化した。また、軌跡の広がり小さくなり、移動量が減少する傾向が見られた。このことから、3 Pa の条件では、足場形状で細胞の配向を制限できないことが示唆された。図 3.1.9A, B に、1, 2 Pa の条件における細胞の経時的な長さの変化を示す。1 Pa のせん断応力環境において、全てのパターン上の細胞の長さが増加と減少を繰り返し、細胞が伸展と退縮を繰り返すことを確認した。図中の赤バーは、せん断応力 0 Pa の条件 (Control) における長さの平均値を示す。1 Pa の条件において、0°パターン上の細胞の長さは増加する傾向にあり、刺激開始から 4 時間後には、Control と同等になることが分かった。しかし、45°、90°パターン上の細胞は、Control と比較して短い傾向があった。2 Pa の条件では、0°のパターン上の細胞の長さも 45°のパターン上の細胞と同様の長さとなり、Control よりも短くなった。90°のパターン上の細胞は、他のパターン上の細胞よりも短くなる傾向が見られ、パターンの角度毎に細胞の挙動が異なった。図 3.1.10 に、1 Pa の条件における細胞の経時的な *Shape Index* 値の変化を示す。全てのパターン上の *Shape Index* 値は Control と比較して小さく、時間の経過と共に増加していった。0°パターン上における *Shape Index* 値は、刺激開始から 4 時間後に Control と同程度となり、90°パターン上における *Shape Index* 値は、他のパターンと比較して小さい傾向があった。図 3.1.11 に、各せん断応力条件における角度と *Shape Index* の関係を示す。3 Pa の条件では、全ての角度で *Shape Index* 値が小さく、1, 2 Pa の条件では、流れの方向に対するパターンの角度の増加と共に、*Shape Index* 値が減少し、細胞が円形状に近づくことが分かった。

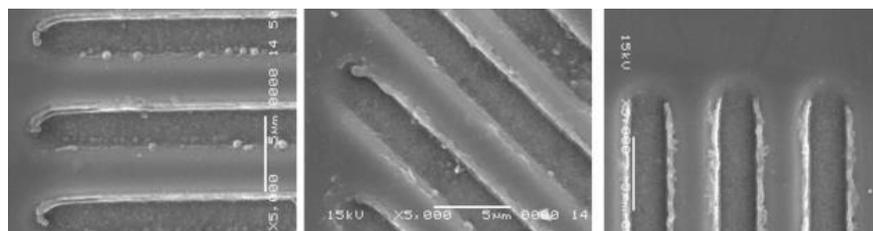


図 3.1.4 テンパックスガラス上に作製したマイクロパターンの SEM 観察像。

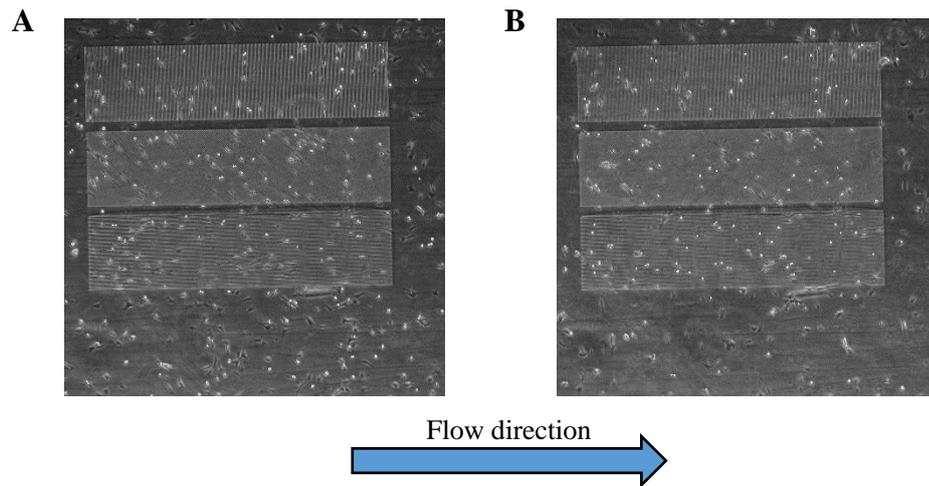


図 3.1.5 3 Pa のせん断応力負荷前後における細胞. 流れ刺激負荷直後 (A), 流れ刺激 4 時間負荷後 (B).

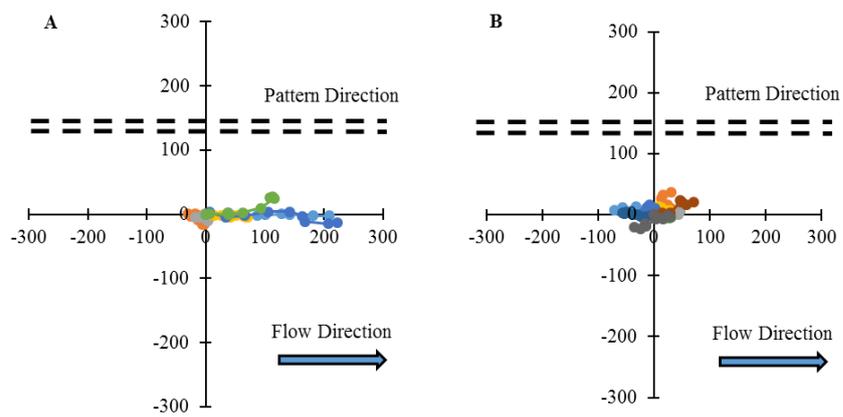


図 3.1.6 0 度パターン上の細胞の遊走, 1 Pa 刺激条件での挙動 (A), 3 Pa 刺激条件での挙動 (B).

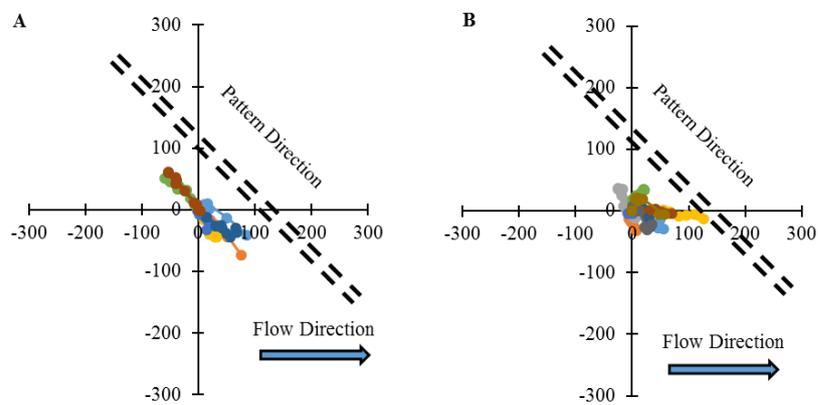


図 3.1.7 45 度パターン上の細胞の遊走, 1 Pa 刺激条件での挙動 (A), 3 Pa 刺激条件での挙動 (B).

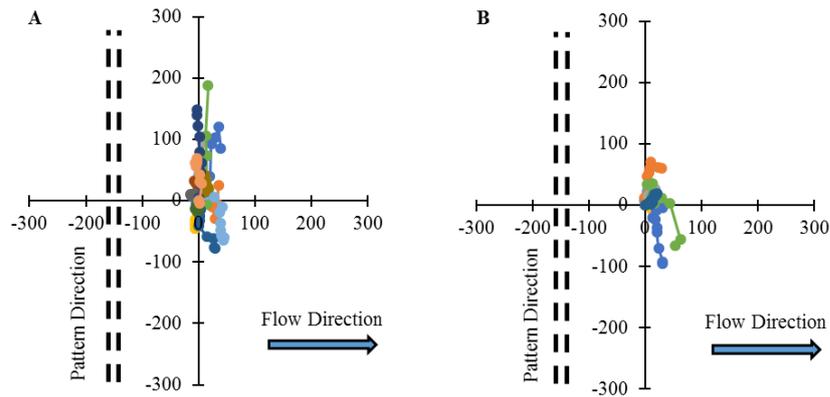


図 3.1.8 90度パターン上の細胞の遊走, 1 Pa 刺激条件での挙動 (A), 3 Pa 刺激条件での挙動 (B).

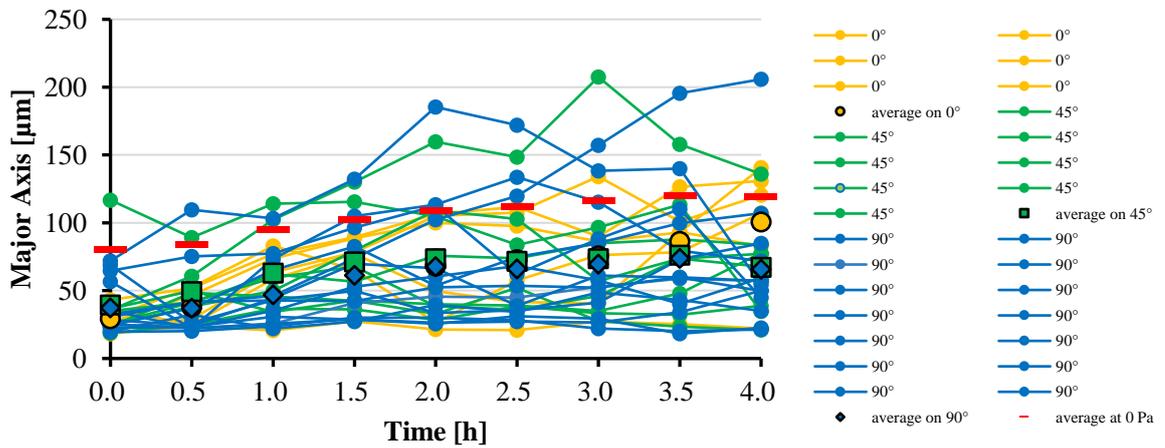


図 3.1.9A 1 Pa 条件における各パターン上の細胞の長軸長さの経時的な変化.

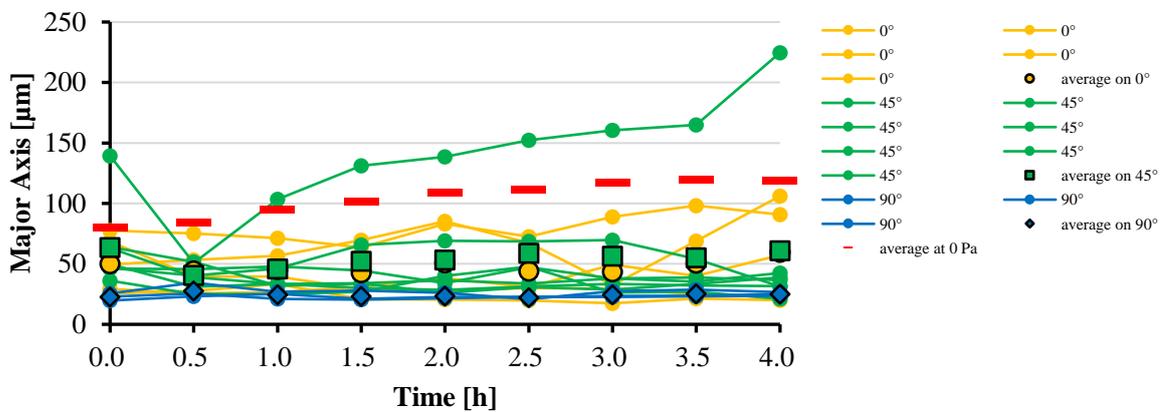


図 3.1.9B 2 Pa 条件における各パターン上の細胞の長軸長さの経時的な変化.

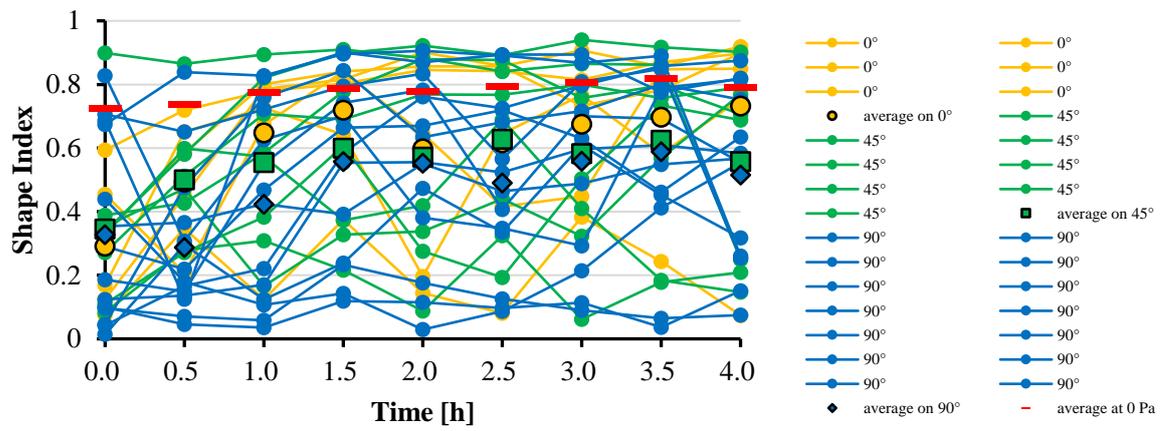


図 3.1.10 1 Pa 条件における各パターン上の細胞の *Shape Index* の経時的な変化.

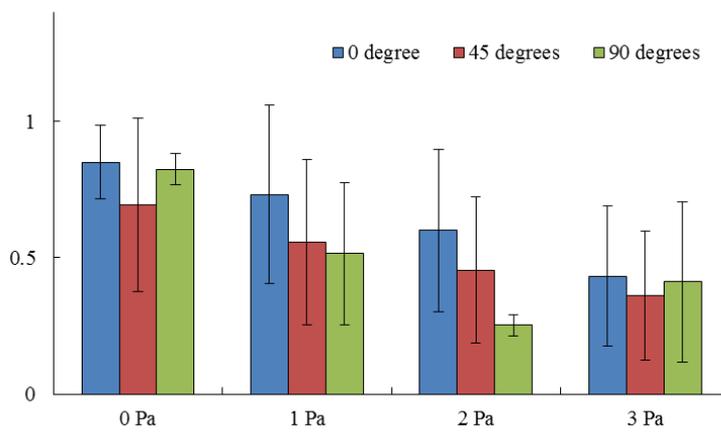


図 3.1.11 各せん断応力条件における角度と *Shape Index* の関係.

3.1.4 考察

これまでに、細胞の機械的刺激に対する応答についての研究が行われてきた^{4-8,10-14, 18-23}。繰り返し伸展する培養基板を利用した細胞への機械的刺激を負荷するシステムでは、機械的刺激が接着たんぱく質を介して細胞へと伝達される^{4,8}。一方、培養液の流動を用いた壁面せん断応力場での培養は、機械的刺激が培養細胞表面に直接的に負荷されるため、定量評価が比較的容易にでき、機械的刺激に対する細胞の応答の研究においては有利である。また、本研究で作製した実験システムでは、細胞の伸展する方向を流路底面に設置したマイクロパターンにより、あらかじめ調節することができるため、細胞の方向に対する流れ刺激の影響を詳細に検討できた点が、本実験システムの優位点と言える。

3 Pa の流れ刺激実験条件では、培養液の密度 = 1000 kg/m^3 、代表速度 (流路内での平均流速) : 0.025 m/s 、代表長さ (流路高さ) = $0.1 \times 10^{-3} \text{ m}$ 、培養液の粘性係数 : 0.002 Pa s としてレイノルズ数を見積もると、1.25 となるため流路内の流れは層流と推定される。マイクロパターン近傍の流れは、細胞播種時のマイクロパターン上を転がる浮遊細胞を利用して観察し、流路の方向に平行に移動する様子を確認している。

本研究で用いたマイクロパターン上では、静置培養 2 時間で 80% 程度の細胞の長軸方向がパターンの方向に対して $\pm 10^\circ$ の範囲に収まり、 $1 \mu\text{m}$ の高さを有するパターンが、C2C12 を配向させる用途として十分に機能したことを示した。第 2 章の結果と比較して、多くの細胞がパターンに配向を示す様子が観察された。この結果は、パターン作製時の表面処理によるパターン表面の形状の違いが原因であると考えられる。その理由として、PDMS のパターン作製では、モールドの表面をパリレン膜でコーティング処理するため、凹凸面の形状が均一となるが、本実験で用いたパターンは表面の凹凸加工後にコーティングを施していない。そのため、パターンの凹凸面で形状 (粗さ) が異なり、多くの細胞が配向する表面を作製できたと考えられる。

1 Pa の条件では、全てのパターン上の細胞の配向は保持され、3 Pa の条件では、パターン上で剥離する細胞が観察され、細胞の配向に影響を与えた (図 3.1.5)。未加工面上の細胞は比較的剥離が少なかったことから、細胞の接着面積と流れ刺激による剥離には関係性があると推測できる。足場の凹凸形状により細胞の接着面積が制限され、細胞は細長い形状に伸展する (図 3.1.11)。そのため、細胞の接着面積は、未加工面よりもパターン上の方が小さくなり、3 Pa の条件では、細胞が剥離したと考えられる。3 Pa の流れ刺激環境では細胞の遊走方向が変化し、特に 45° のパターン上ではパターンを越えて遊走する様子が確認できた (図 3.1.7)。このことには、パターン同士の間隔が関係していると考えられる。流れ刺激が弱い (1 Pa) 場合には、パターン上の細胞はパターンの方向へ遊走を示すが、せん断応力が 3 Pa のときは、細胞の流体抗力により溝方向へ押されてパターン間を移動した。本研究で用いたパターンの間隔は $3 \mu\text{m}$ であることから、細胞体は溝の底面に侵入することはできない。そのため、強い流れ刺激環境 (3 Pa) では、パターン間での移動を示し、細胞の軌跡がパターンの方向から逸れると考えられる。Shape Index 値の経時的変化 (図 3.1.10) から、流れ刺激開始直後 (0 時間) に、1 Pa の条件で Shape Index 値が静置培養条件と比較して小さくなった。本研究ではシリンジポンプを用いて培養液を流動させた。そのため、実験開始直後の流路内圧力が安定していない可能性がある。実験開始直後に強いせん断応力が負荷され

たことが原因となり、実験開始直後の *Shape Index* 値が静置培養条件と比較して小さくなり、細胞が円に近い形状をとったと考えられる。しかし、細胞の *Shape Index* の結果において、それぞれのせん断応力条件で変化が見られることや、パターン毎に差が見られることから、流れ刺激負荷直後の流れの不安定な期間が、本実験システムで得られた結果に大きく影響するものではなく、本実験システムは、細胞の方向を制御した上での流れ刺激への応答を調査することが可能であるといえる。本研究では、流れに対する細胞の方向を変化させることで、均一な機械的刺激場における応答が変化するという仮説のもと研究を行った。既述の結果から流れ方向に対する細胞の方向は、細胞の長さに影響を与えるといえる。

3.1.5 結 言

平行平板間における Poiseuille 流れ型の流速分布の式を用いて、細胞培養面におけるせん断応力を算出した。流路の底面には $3\ \mu\text{m}$ 間隔の浅い微小凹凸縞模様 (マイクロパターン) を、流れの方向に対して 0° , 45° , 90° となるように作製した。経時的な観察画像において同一細胞の応答を追跡した。その結果、培養基板上における細胞の長さ、伸展方向、遊走方向は、縞模様の方向毎に異なることがわかり、流れの方向に対する細胞長軸の角度が増加すると、流れ刺激の影響が大きくなることがわかった。また、 1 , 2 , $3\ \text{Pa}$ とせん断応力の大きさを変化させたところ、 $3\ \text{Pa}$ においては足場の影響よりも流れの影響が大きくなるが、 $1\ \text{Pa}$ では足場縞模様の方向に応じて細胞応答が変化した。以上のことから、微細加工面を流路内に設置することで、細胞の方向を制御した上での流れ刺激への応答を調査することが可能であることがわかった。

3.2 回転する円板を用いた流路における壁面せん断応力が培養細胞に及ぼす影響²⁾

3.2.1 緒 言

生体内において細胞は複雑な力学環境にさらされており、それらに反応することで生命活動を維持している。せん断応力は生体内で発生している機械的刺激の一つである。流れ場における細胞には流体を介してせん断応力が作用し、定量的な機械的刺激の負荷の方法として有効である。これまでに、せん断応力環境にさらされた血管内皮細胞は、流れの方向に配向することが知られ^{7,8)}、配向に至る機構や刺激の受容機構についても理解が成されてきた²⁵⁾。しかし、せん断流れ刺激を血管構成細胞以外に適用した例は少ない。血管内皮細胞だけでなく、生体を構成する細胞の挙動制御方法の開発は、多様な細胞を扱う細胞工学の分野において重要な課題といえる。一方、非生理的力学刺激にも細胞が反応することが報告されている。例えば、微小振動²⁶⁻²⁸⁾、過重力²⁹⁻³¹⁾等を細胞へ負荷することで、骨・筋・神経等の細胞の形態や接着性、分化調節に影響を与えることが報告されている。このように、生体内において日常的ではない刺激に対しても細胞は反応を示す。様々な力学環境における細胞反応についての理解を深めることで、新しい細胞挙動の制御方法の開発が期待できる。足場との接着たんぱく質を介して伝わる機械的刺激の大きさを推定

する「これまでの機械的刺激に対する細胞応答の研究²³⁾」とは異なる。本研究では、再生医療への応用に向けた新しい細胞の操作技術の開発を目指し、単一の筋芽細胞 (C2C12) のせん断場での挙動を調査し、挙動制御に関する基礎的な検討を行った。骨格筋芽細胞は、バイオアクチュエータへの応用⁴⁾や、心筋細胞の代替細胞として再生医療への応用が期待されている。しかし、せん断流れ刺激に対する C2C12 の応答について調べた研究は見当たらず、せん断応力に対する応答について理解されていない。筆者らはこれまでに、C2C12 のせん断流れに対する応答の調査を行い、C2C12 が流れの方向に対して垂直な方向に配向する傾向があるという結果を得ているが³²⁾、実験系がせん断応力定量に向いておらず、細胞が応答を示すせん断応力の値を算出することができなかった。そこで本研究では、Couette 型せん断流れを発生する装置を作製し、C2C12 の挙動を経時的に観察した。その時の細胞の形状や遊走に着目して解析を行い、壁面せん断応力と C2C12 の応答との関係について検討した。また、MC3T3-E1 (骨芽細胞) を比較対象として用い、細胞種によるせん断応力への応答について検討した。

3.2.2 実験方法

3.2.2.1 せん断流れ刺激装置の作製

本実験では、一般的なプラスチック製の培養皿 (組織培養用ディッシュ 60 mm, IWAKI) に接着した細胞に対して、せん断応力が発生する装置を作製し (図 3.2.1)、せん断応力が C2C12 の遊走方向に及ぼす影響を調査した。回転円板は培養皿底面と平行になるように設置されており、培養液中でポリカーボネート製の円板を回転することで、培養皿底面にせん断流れが発生する設計とした (図 3.2.2)。せん断流れ刺激装置は顕微鏡ステージ上に設置され (図 3.2.3)、ステップモーターを用いて駆動し、インキュベータ外に設置したドライバユニット (CSA-UR42D1-SA-PS, シナノケンシ株式会社) を用いて制御した。回転する円板と静止する培養面との間には、クエット流れが発生する。細胞培養面に発生する流れのモデルを示す (図 3.2.2)。駆動時のせん断速度は、式 (1) を用いて計算した。

$$\gamma = \frac{r\omega}{d} \quad (1)$$

ここで、 γ はせん断速度 [s^{-1}]、 r は回転軸から半径方向への距離 [m]、 ω は回転板の角速度 [rad/s]、 d は回転板底面と培養面との距離 [m] である。回転板と培養面の距離 d は、実験開始直前に顕微鏡のステージを用いてマイクロメートルオーダで測定した。培養面に発生するせん断応力は、式 (2) を用いて計算した。

$$\tau = \eta\gamma \quad (2)$$

ここで、 τ はせん断応力 [Pa]、 η は培養液の粘度 [Pa s] である。また、培養液の粘度は粘度計 (バイオレオライザ, 東京計器) を用いて測定し、0.002 Pa s を使用した。式 (2) より、発生するせん断応力は、回転軸から半径方向への距離 r に比例して変化する。すなわち、装置内には回転板の半径方向へせん断応力の勾配が発生する。

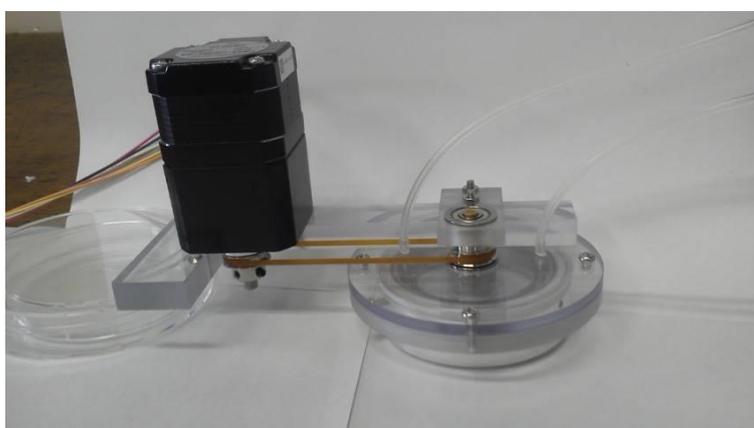


図 3.2.1 作製したジェット流れ刺激装置。

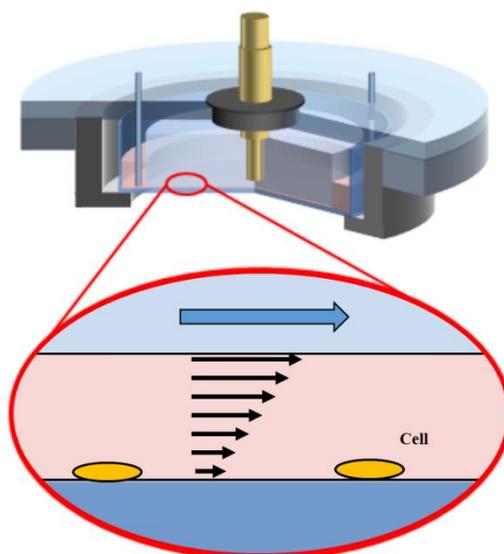


図 3.2.2 装置の断面及び細胞培養環境におけるジェット流れのモデル。

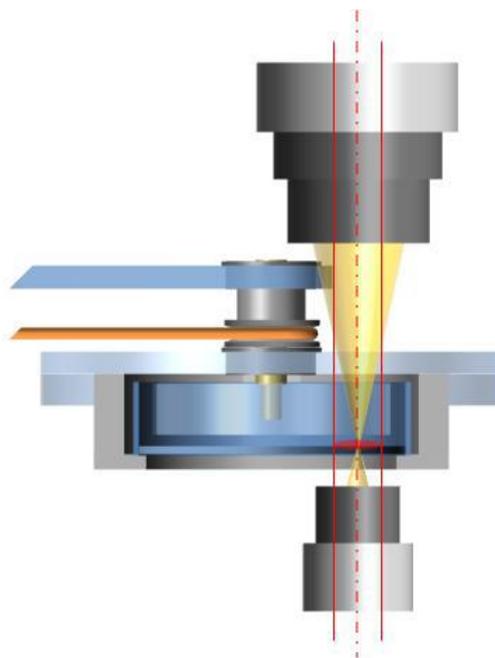


図 3.2.3 装置断面と細胞観察における落射照明と培養位置の関係.

3.2.2.2 せん断流れ刺激実験

本研究では、継代数 10 までの筋芽細胞 (C2C12) とマウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を使用した。培養にはウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum, Sigma-Aldrich) を 10%, 抗生物質 (Penicillin-Streptomycin (100,000 U/mL), Thermo Fisher Scientific) を 1% 含む DMEM 培地 (Dulbecco's modified eagle medium, Gibco) 及び α MEM (Alpha modified Eagle minimum essential medium) を用いた。実験時の細胞密度を 1000 cells/cm² とし, CO₂ インキュベータ (MCO-20AIC, パナソニック) 内, 37°C, 湿度約 100%, 5%-CO₂ 環境下で 24 時間静置培養した。顕微鏡のステージを 10, 15, 18, 20 mm と移動させることで (図 3.2.4), 異なる大きさのせん断応力条件下の細胞挙動を観察した。また, 観察位置を移動して複数点の観察を行った。また, せん断応力の大きさを変更するために, 円板の回転数を 50, 100, 200, 400 rpm で変化させた。インキュベータ外で 30 分間の刺激負荷後, 30 分間せん断刺激無負荷状態の細胞を観察した。その後, 細胞試料をインキュベータ環境に移動し, 3 時間静置培養した。



図 3.2.4 流路内の細胞の観察.

3.2.2.3 評価方法

細胞の観察画像を汎用画像解析ソフトウェア (Image-J, NIH) を用いて解析した. 本研究では, 細胞に生じる壁面せん断応力が回転軸からの距離 r に比例して大きくなるため, 壁面せん断応力の値は観察視野内においても変化する. 壁面せん断応力に対する各細胞の挙動を比較するため, 観察視野内に存在する細胞を一つのグループとして整理し, 評価を行った. 細胞の有する角度を流れ方向と長軸のなす角度 θ とした. 刺激負荷開始から 30 分後の細胞の観察画像, 及び 3 時間静置後の画像を解析した. 細胞の観察画像を図 3.2.5 に示す. また, 図 3.2.5 の二値化画像を図 3.2.6 に示す. 二値化した画像は, ImageJ の解析ツールを用いて細胞の輪郭に合致する楕円形状に自動で近似した (図 3.2.7). 近似した楕円を面積によって分類し, 無数の楕円が混在する画像から細胞のみを抽出し (図 3.2.8), 細胞の長軸方向と培養皿の周方向 (流れの方向) との角度を測定した.

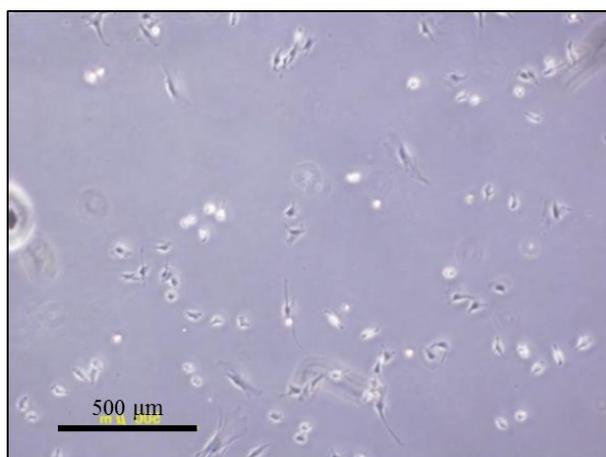


図 3.2.5 C2C12 の位相差観察画像.

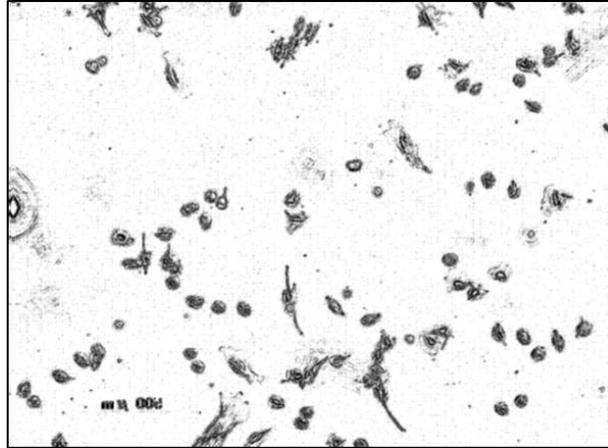


図 3.2.6 ImageJ による位相差画像の二値化.

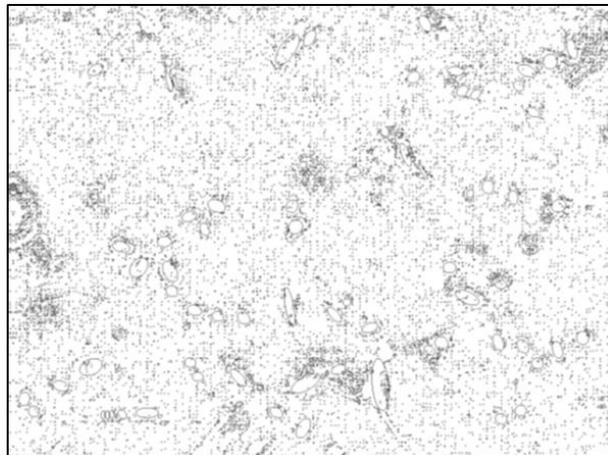


図 3.2.7 細胞の楕円近似用画像処理.

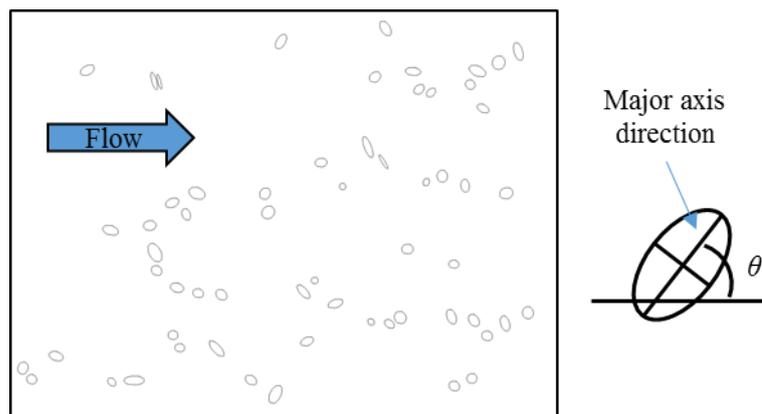


図 3.2.8 楕円近似後の細胞の角度の測定.

3.2.3 実験結果

せん断流れ刺激を負荷した MC3T3-E1 の観察画像を図 3.2.9 に示す. この時, 流れの方向は右から左である. 流れ刺激環境における細胞の角度の分布を調査するため, 縦軸に細胞の有する角度 (θ), 横軸に同一観察画面に存在する各細胞を, 角度が小さい順に並べて表示した. 角度の分布を示すグラフは図 3.2.10 に示すように, グラフの形状から角度の分布傾向を読み取ることができる. (図 3.2.11-13) 400 rpm では, 流線方向に伸展し, 流れの中で剥離する様子が観察できた. また, 200 rpm においても細胞が剥離した. C2C12 は 0.2 Pa 以上のせん断流れ刺激を 30 分間負荷した場合, 剥離が見られ, MC3T3-E1 は仮足を伸展させ, 方向を転換する様子が観察できた. 図 3.2.11 に観察時間における C2C12 細胞の角度分布を示す. 50 rpm (0.16 Pa), $r = 12$ mm 地点での細胞の角度分布を示す. 図 3.2.12A, B はそれぞれ, 100 rpm (0.32 Pa), $r = 12$ mm と 100 rpm (0.42 Pa), $r = 16$ mm の条件における C2C12 の角度を示す. 図 3.2.13A, B はそれぞれ, 400 rpm (1.3 Pa), $r = 12$ mm と 400 rpm (1.7 Pa), $r = 16$ mm の条件における MC3T3-E1 の角度を示す. 角度縦軸に角度を示し, 横軸には細胞の有する角度を昇順に並べた. 菱形のプロットは刺激開始前の細胞の角度の分布, 四角は刺激負荷 30 分, 丸は刺激負荷後 30 分, 三角は刺激後 3 時間後の角度の分布を示す. 角度の分布の成す曲線は, 細胞の分布を表しており, 傾きが大きくなるとその角度に細胞の分布が少なく, 傾きが小さいほど細胞の分布が多いことを意味する. 90 度に分布する細胞の数は減少し, 40-70 度, 110-150 度に分布する細胞の数は増加した. 0.3 Pa < 0.4 Pa のせん断応力環境では, C2C12 は 30 分間の刺激で流線方向からずれる様子が確認できた. MC3T3-E1 は 90 度に分布する細胞の数が減少し, 0.4-1.7 Pa 条件における 30 分間の刺激直後には流線方向 (0 度) に分布する傾向がみられた.

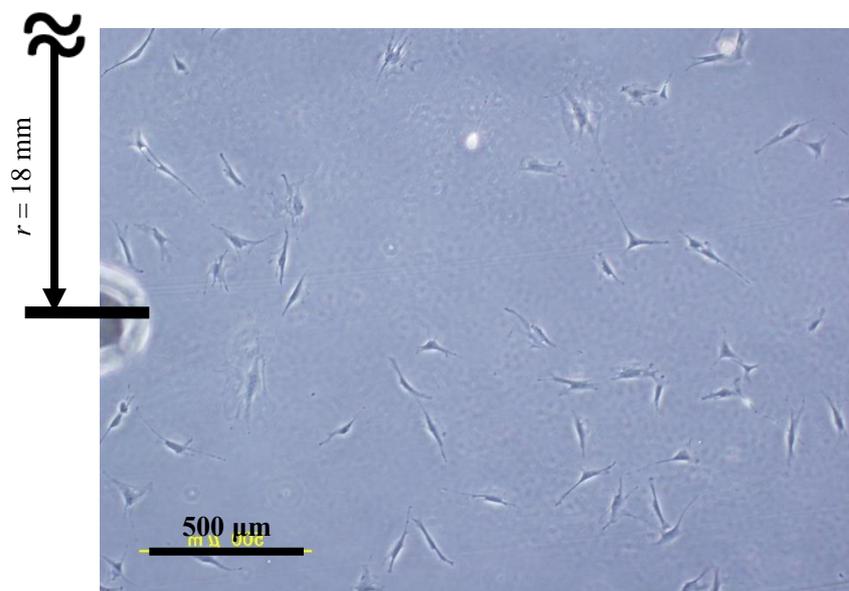


図 3.2.9A せん断流れ刺激負荷前の $r = 18 \text{ mm}$ (400 rpm) における MC3T3-E1.

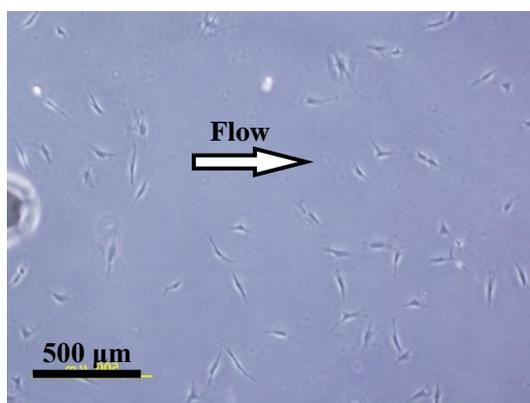


図 3.2.9B せん断流れ刺激負荷直後 (1.9 Pa) における MC3T3-E1.

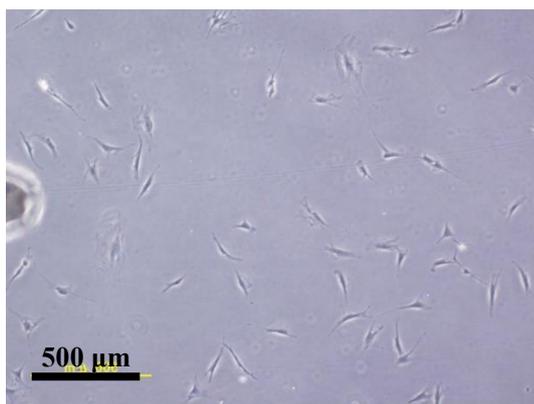


図 3.2.9C 流れ刺激負荷後 30 分間静置した MC3T3-E1.

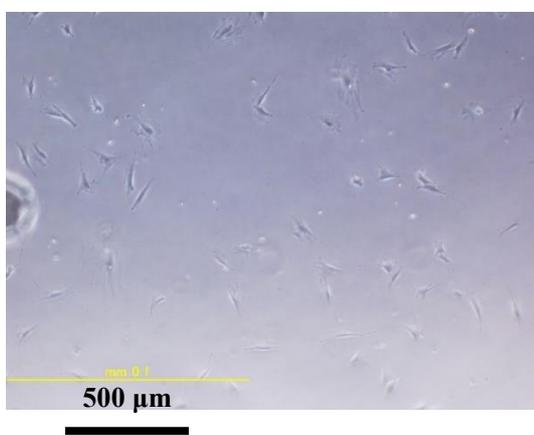


図 3.2.9D 流れ刺激負荷後 3 時間静置した MC3T3-E1.

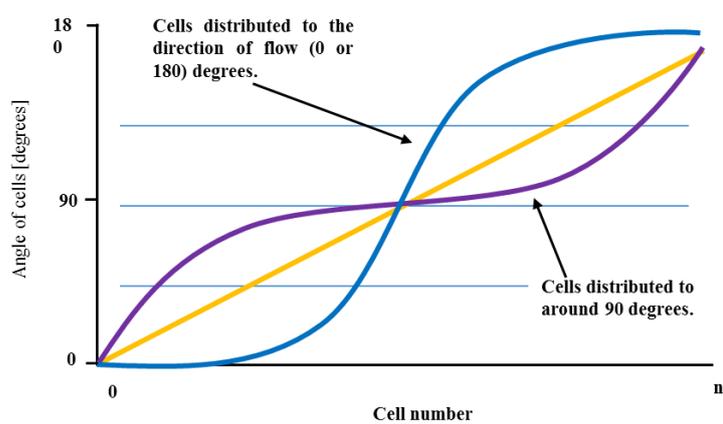


図 3.2.10 細胞の角度の分布例.

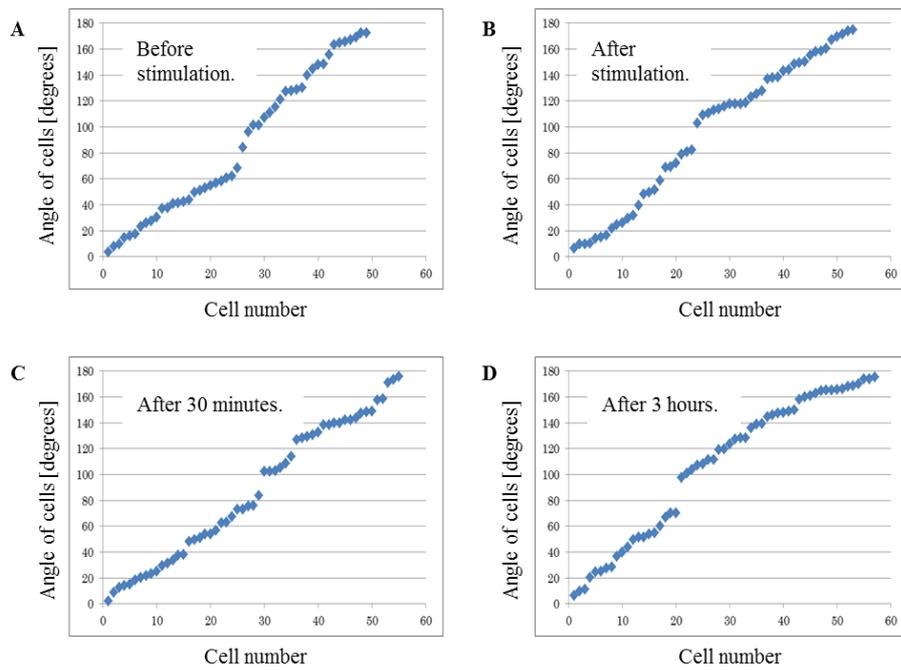


図 3.2.11 回転数 50 rpm, $r = 12$ mm, 0.16 Pa 条件における C2C12 の角度分布の経時的な変化.

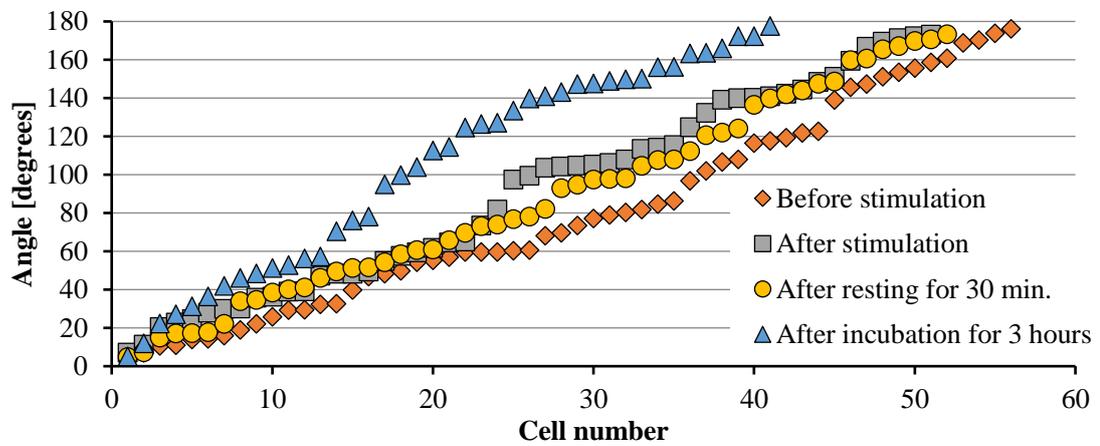


図 3.2.12A 回転数 100 rpm, $r = 12$ mm, 0.32 Pa 条件における C2C12 の角度分布の経時的な変化.

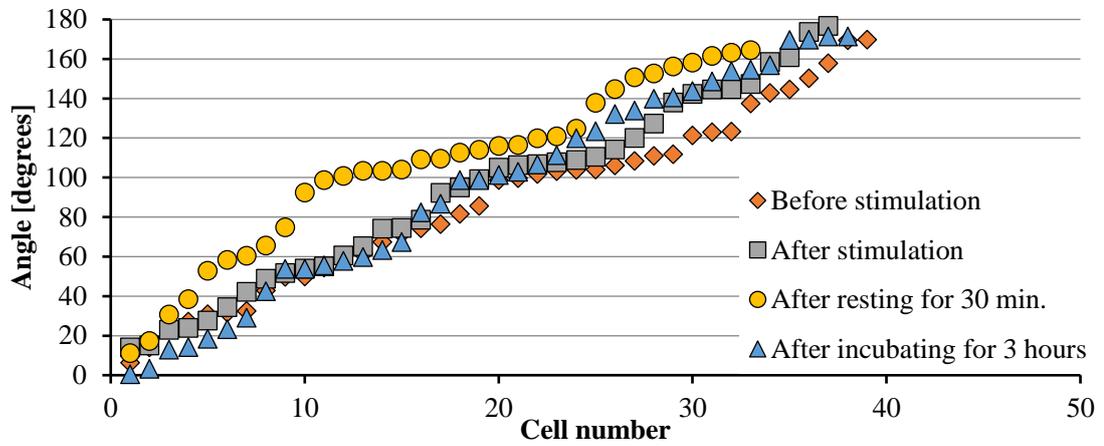


図 3.2.12B 回転数 100 rpm, $r = 16$ mm, 0.42 Pa 条件における C2C12 の角度分布の経時的変化.

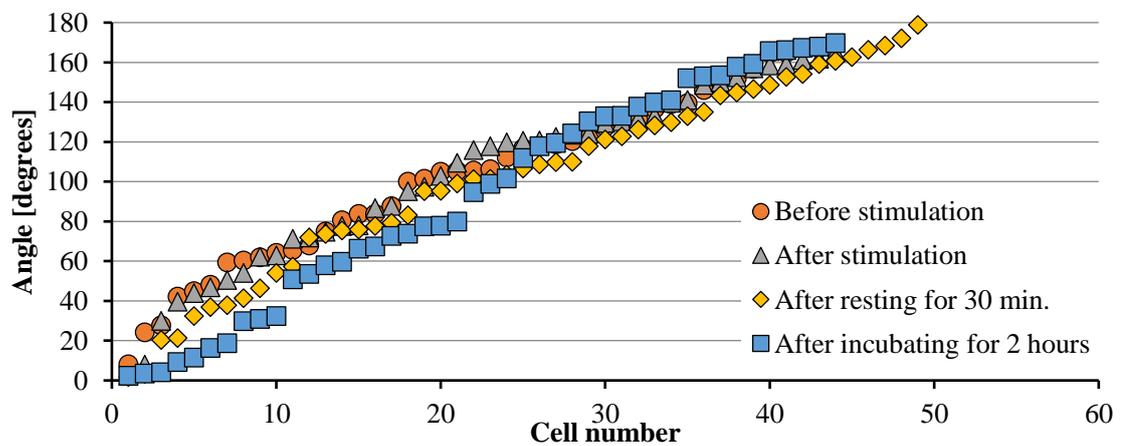


図 3.2.13A 回転数 400 rpm, $r = 12$ mm, 1.3 Pa 条件における MC3T3-E1 の角度分布の経時的変化.

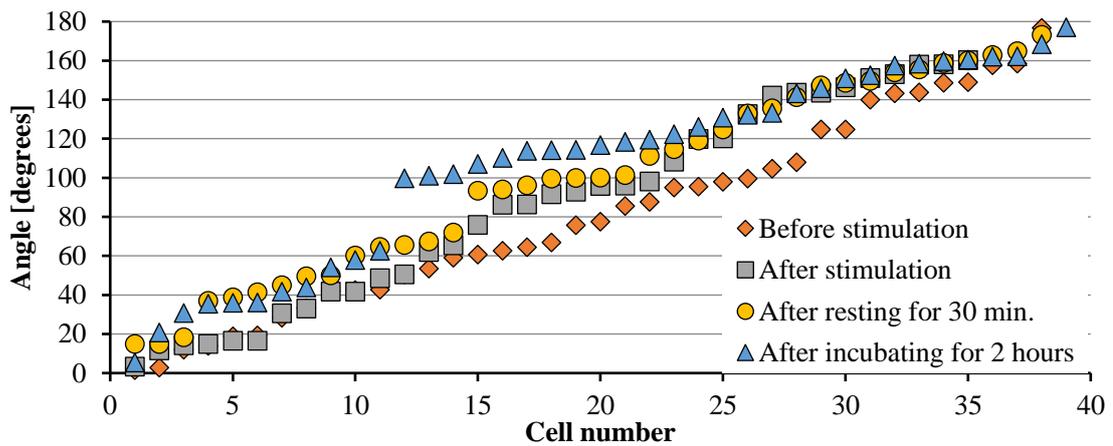


図 3.2.13B 回転数 400 rpm, $r = 16$ mm, 1.7 Pa 条件における MC3T3-E1 の角度分布の経時的変化.

3.2.4 考 察

一定の角速度 10 rad s^{-1} ($d = 0.8 \text{ mm}$) では、軸からの距離 (r) が 12 mm から 10 mm 増加すると、せん断速度 γ は 150 s^{-1} から、 230 s^{-1} まで増加する。せん断応力の勾配環境を作製することで、同じ観察視野において、せん断応力の変化に対する細胞の応答を観察することができた。複数のせん断応力に対する継代数が等しい細胞の挙動を同じ実験で観察できた。更に、せん断応力発生面に汎用培養皿を使用することができ、様々な細胞の応答を容易に観察できる点は、本実験装置の優位な点であるといえる。

回転により発生する流れは、遠心効果によって二次流れを誘発する。本実験装置においても遠心力によって流れの方向が円周方向からずれることが観測された。接着していない細胞 (剥離, 死細胞) の流れを観察することで実際の流れの方向を定めた。また、細胞培養チャンバ内のレイノルズ数は式 (3) を用いて計算した。

$$Re = \frac{\rho v d}{\eta} = \frac{\rho \omega d}{\eta} \quad (3)$$

ここで、 ρ は流体の密度、 v は周速である。 ρ , r , ω , d がそれぞれ 1000 kg/m^3 , 0.018 m , 42 rad/s , 0.0008 m , 0.002 Pa s のとき、 Re 数が 300 となった。 Re の値からは、層流に近いながれと推定される。

血管内皮細胞は血管内においてせん断応力にさらされており、血管内皮細胞に対するせん断応

力の影響はこれまでに研究されている^{25, 33-38)}。本研究では、0.21 Pa以下のせん断応力環境では、C2C12は流線の方角に対して傾いた方角に伸展し、MC3T3-E1はせん断応力に晒された後の一定の時間に変形し、配向する傾向があることを示し、これまでに調査されている血管構成細胞以外の細胞の定量せん断応力環境下における挙動を観察した。また、経時的な観察を行うことで、細胞の角度が時間の経過に伴って変化することを示した。このことは、細胞が流れ方向に従う挙動と流れ方向と別の挙動を有していることを意味する。浮遊時の細胞はテンセグリティ構造と呼ばれる、張力と圧縮のみで構成されたモデルで表現される。そのため、外部からの機械的刺激を受けた場合は、力の方角へ変形する。血管内皮細胞は、流れ刺激を負荷されると刺激の方角に細胞内骨格束(ストレスファイバ)を形成し、配向することが知られている。これは、流れによる変形が細胞骨格の形成方角に影響を与えた結果であると考えられる。本研究では、MC3T3-E1は流れの方角への配向を示した。しかし、C2C12は刺激方角に対して垂直な方角へ伸展している様子が観察された。先行研究によると、繰返伸展する弾性膜上で培養されたC2C12の挙動について調査し、伸展方角と垂直な方角に筋芽細胞が配向を示したことを報告している²³⁾。これは、弾性膜の変形に伴って変形する細胞組織が、細胞が伸展方角に対して垂直な方角を向くことで最小になることが原因であると考えられ、本研究で得られた結果と類似している。このことから、本装置を用いて観察できたC2C12の流れ刺激方角に対する挙動は、流れ刺激による細胞の内部ストレスを最小にする挙動であると推測できる。一方、山口らは平面上に接着する細胞モデルを用い、細胞の方角や高さ等の形状とせん断応力の関係についてシミュレーションを行い、細胞が流れの方角に対して垂直な方角を向く場合、細胞の長さに応じてせん断応力の値が変化することを報告している²⁴⁾。本実験では、細胞組織の培養の前段階として単一の細胞に対して実験を行った。このことから、本研究における細胞は、山口らの研究結果を当てはめることができる。そのため、流れに垂直な方角に進展しているC2C12に負荷されるせん断応力の値は、細胞の核上部周辺で最大となり、細胞に負荷されるストレスを小さくする挙動とは言えない。このことから、細胞の由来により刺激に対する応答が異なる可能性が示唆された。本実験では、細胞の密度を2000 cells/cm²と比較的少ない密度で行った。繰返伸展刺激は集密状態の組織に対する結果であり、細胞間接着が存在するため、組織培養の段階では、細胞の密度を考慮した実験を行う必要があると考える。また、本研究では、刺激環境を生体内環境と揃えることが技術的に難しく、細胞への流れ刺激の負荷はインキュベータ外で行った。しかし、細胞の生理的活性は、生体内環境に左右されるため、今後、刺激負荷時における実験環境の改善が必要であるといえる。

3.2.5 結 言

回転する円板を用いて、生体外でCouette型の壁面せん断応力刺激を細胞に負荷し、顕微鏡下で観察できる実験システムを設計した。その結果、C2C12はせん断応力環境下において流れの方角に対して斜め方角を向く傾向があり、MC3T3-E1は、壁面せん断ながれ刺激を負荷した後に流れ方角への配向を示した。作製したシステムは定量的に制御可能な壁面せん断流れ刺激を細胞に負荷することができ、優位性がある。

参考文献

1. H. Hino, S. Hashimoto, Y. Shinozaki, H. Sugimoto and Y. Takahashi, "Effect of Flow on Cultured Cell at Micro-pattern of Ridge Lines, Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics, Vol.15, No.5, 2017, pp.1-7.
2. H. Hino, S. Hashimoto, Y. Takahashi and M. Ochiai, "Effect of Shear Stress in Flow on Cultured Cell : Using Rotating Disk at Microscope, Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics, Vol.14, No.14, 2016, pp.6-12.
3. S. Durrani, M. Konoplyannikov, M. Ashraf and K.H. Haider, "Skeletal myoblast for cardiac repair", Regenerative Medicine, Vol.5, No.6, 2010, pp.919-932.
4. W.W. Ahmed, T. Wolfram, A.M. Goldyn, K. Bruellhoff, B.A. Rioja, M. Möller, J.P. Spatz, J. Groll and R. Kemkemer, "Myoblast morphology and organization on biochemically micro-patterned hydrogel coatings under cyclic mechanical strain", Biomaterials, Vol.31, No.2, 2010, pp.250-258.
5. D.L. Yamamoto, R.I. Csikasz, Y. Li, G. Sharma, K. Hjort, R. Karlsson and T. Bengtsson, "Myotube formation on micro-patterned glass: Intracellular organization and protein distribution in C2C12 skeletal muscle cells", Journal of Histochemistry & Cytochemistry, Vol.56, No.10, 2008, pp.881-892.
6. T.D. Brown, "Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review", Journal of Biomechanics, Vol.33, No.1, 2000, pp.3-14.
7. R. Chandran, T.J. Knobloch, M. Anghelina and S. Agrwal, "Biomechanical signals upregulate myogenic gene induction in the presence or absence of inflammation", American Journal of Physiology Cell Physiology, Vol.293, No.1, 2007, pp.267-276.
8. J-H.C. Wang, Y. Guoguang, Z. Li and W. Shen, "Short communications Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction", Journal of Biomechanics, Vol.34, No.4, 2004, pp.573-576.
9. T.J. Flaherty, E.J. Pierce, J.V. Ferrans, J.D. Patel, K.W. Tucker and L.D. Fry, "Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events", Circulation Research, Vol.30, No.1, 1972, pp.23-33.
10. N. Kataoka, S. Ujita and M. Sato, "Effect of flow direction on the morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells", Medical & Biological Engineering & Computing, Vol.36, No.1, 1998, pp.122-128.
11. H. Hino, M. Ochiai, S. Hashimoto, K. Kimura, Y. Takahashi and T. Yasuda, "Effect of Wall Shear Stress in Flow on Myoblast", Proc. 19th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.2, 2015, pp.246-251.

12. F. Sato, S. Hashimoto, T. Yasuda and H. Fujie, "Observation of Biological Cells in Rhombus Parallelepiped Flow Channel", Proc. 17th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.1, 2013, pp.25-30.
13. H. Hino, S. Hashimoto, Y. Takahashi and S. Nakano, "Design of Cross Type of Flow Channel to Control Orientation of Cell", Proc. 20th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.2, 2016, pp.117-122.
14. H. Hino, M. Ochiai, S. Hashimoto, K. Kimura, Y. Takahashi and T. Yasuda, "Effect of Wall Shear Stress in Flow on Myoblast", Proc. 19th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.2, 2015, pp.246-251.
15. K. Sugimoto, Y. Takahashi, H. Hino and S. Hashimoto, "Effect of Aspect Ratio of Checkered (Ichimatsu) Convexo-concave Micro-pattern on Orientation of Cultured Cells", Proc. 20th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.2, 2016, pp.141-146.
16. I.E. Palama, A.M.L. Coluccia, G. Gigli and M. Riehle, "Modulation of Alignment and Differentiation of Skeletal Myoblasts by Biomimetic Materials", Integrative Biology, Vol.4, No.10, 2012, pp.1299-1309.
17. E. Martines, K. Mcghee, C. Wilkinson, A. Curtis, "A parallel-plate flow chamber to study initial cell adhesion on a nanofeatured surface", IEEE Transaction on NanoBioscience, Vol.3, No.2, 2004, pp.90-95.
18. H. Hino, S. Hashimoto and F. Sato, "Effect of Micro Ridges on Orientation of Cultured Cell", Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics, Vol.12, No.3, 2014, pp.47-53.
19. Y. Takahashi, S. Hashimoto, H. Hino and T. Azuma, "Design of Slit between Micro Cylindrical Pillars for Cell Sorting", Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics, Vol.14, No.6, 2016, pp.8-14.
20. S. Hashimoto and M. Okada, "Orientation of Cells Cultured in Vortex Flow with Swinging Plate in Vitro", Journal of Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.9, No.3, 2011, pp.1-7.
21. M. Ochiai, S. Hashimoto and Y. Takahashi, "Effect of Flow Stimulation on Cultured Osteoblast", Proc. 18th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.2, 2014, pp.156-161.
22. S. Hashimoto, F. Sato, H. Hino, H. Fujie, H. Iwata and Y. Sakatani, "Responses of Cells to Flow in Vitro", Journal of Systemics Cybernetics and Informatics, Vol.11, No.5, 2013, pp.20-27.
23. 戸塚実, 千葉美麗, 三谷英夫, "骨格筋細胞に対する機械的伸展刺激の影響に関する研究", 歯科基礎医学雑誌, Vol.42, No.3, 2000, pp.233-244.
24. 山口隆美, 内皮細胞はなぜ変形, 配向するのか—動脈内皮細胞の形状, 配向の変化と血流の関係についての計算流体力学的試論, 日本機械学会論文集 B 編, Vol.60, No.579, 1994, pp.3665-3671.
25. K.A. Barbee, P.F. Davies and R. Lal, "Shear Stressinduced Reorganization of the Surface Topography

- of Living Endothelial Cells Imaged by Atomic Force Microscopy”, *Circulation Research*, Vol.74, No.1, 1994, pp.163-171.
26. G. Ciofani, L. Ricotti, J. Rigosa, A. Menciassi, V. Mattoli and M. Monici, “Hypergravity effects on myoblast proliferation and differentiation”, *Journal of bioscience and bioengineering*, Vol.113, No.2, 2012, pp.258-261.
 27. G.G. Genchi, F. Cialdai, M. Monici, B. Mazzolai, V. Mattoli and G. Ciofani, “Hypergravity stimulation enhances PC12 neuro-like cell differentiation”, *BioMed Research International*, Vol.2015, 2015, 10 pages.
 28. S. Hashimoto, H. Hino and T. Iwagawa, “Effect of Excess Gravitational Force on Cultured Myotubes in Vitro”, *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol.11, No.3, 2013, pp.50-57.
 29. Y. Ito, T. Kimura, Y. Ago, K. Nam, K. Hiraku, K. Miyazaki, T. Masuzawa and A. Kishida, “Nano-vibration effect on cell adhesion and its shape”, *Bio-Medical Materials and Engineering*, Vol.21, No.3, 2011, pp.149-158.
 30. H. Park, M.C. Yip, B. Chertok, J. Kost, J.B. Kobler, R. Langer and S.M. Zeitels, “Indirect low-intensity ultrasonic stimulation for tissue engineering”, *Journal of Tissue Engineering*, Vol.2010, 2010, pp.1-9.
 31. H. Hino, S. Hashimoto, Y. Takahashi and H. Nakajima, “Effect of Ultrasonic Vibration on Proliferation and Differentiation of Cells”, *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol.14, No.6, 2016, pp.1-7.
 32. 中尾誠, 赤土和也, 山崎健一, 寺田堂彦, 藤里俊哉, 吉浦昌彦, 筒井博司, “培養骨格筋のバイオアクチュエータへの応用”, *生体医工学*, Vol.47, No.6, 2009, pp.560-565.
 33. S.C. Daxini, J.W. Nichol, A.L. Sieminski, G. Smith, K.J. Gooch and V.P. Shastri, “Micropatterned polymer surfaces improve retention of endothelial cells exposed to flow-induced shear stress”, *Biorheology*, Vol.43, No.1, 2006, pp.45-55.
 34. P. Uttayarat, M. Chen, M. Li, F.D. Allen, R.J. Composto and P.I. Leikes, “Microtopography and Flow Modulate the Direction of Endothelial Cell Migration”, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, Vol.294, No.2, 2008, pp. H1027-H1035.
 35. R.H.W. Lam, Y. Sun, W. Chen and J. Fu, “Elastomeric Microposts Integrated into Microfluidics for Flow-Mediated Endothelial Mechanotransduction Analysis”, *Lab on a Chip*, Vol.12, No.10, 2012, pp. 1865-1873.
 36. M. Gouverneur, B. Berg, M. Nieuwdorp, E. Stroes and H. Vink, “Vasculoprotective Properties of the Endothelial Glycocalyx: Effects of Fluid Shear Stress”, *Journal of Internal Medicine*, Vol.259, No.4, 2006, pp.393-400.
 37. A.R. Pries and T.W. Secomb, “Microvascular Blood Viscosity In Vivo and the Endothelial Surface Layer”,

American Journal of Physiology- Heart and Circulatory Physiology, Vol.289, No.6, 2005, pp. 2657-2664.

38. T.D. Oblak, P. Root and D.M. Spence, "Fluorescence Monitoring of ATP-Stimulated, Endothelium-Derived Nitric Oxide Production in Channels of a Poly(dimethylsiloxane)-Based Microfluidic Device", Analytical Chemistry, Vol.78, No.9, 2006, pp.3193-3197.

第4章

細胞に対する超音波振動刺激の影響^{1,2)}

4.1 緒言

超音波振動は水中探査などの用途から加湿器や美顔器などの生活的な用途まで幅広く利用されている。医療の分野においても超音波が利用されており、骨や筋肉の治療に用いられてきた³⁾。主として骨の治療では振動子が高周波信号を断続的に送ることでパルス的な超音波振動を発生させ、振動エネルギーによる温度上昇等の熱的要素を除去し、患部に振動を伝える低強度パルス超音波振動 (Low-Intensity Pulsed Ultra Sonic : LIPUS) が用いられており、患部が浅い場合には3 MHz、深い場合には1 MHzの周波数が有効的とされている。筋の治療では継続的に振動を伝える低強度超音波振動 (Low-Intensity Ultra Sonic : LIUS) が用いられ、患部の温度を上昇させ、熱的効果を含めた治療が行われている。細胞へ外部から力学刺激を与えると細胞の持つ様々な挙動に影響を及ぼすことが知られている。細胞の挙動は、移動、増殖、分化、配向等であり、これらは細胞の持つ性質や種類によって異なる。LIPUSと細胞の応答に関する研究では、*In vitro*における細胞への影響が調査され⁴⁻⁶⁾、LIPUSを用いた骨髄間質細胞の石灰化促進に対する定量評価^{3,7)}や細胞の活性の増加³⁾が調査されてきた。また、筋細胞に対しては、LIPUSは筋芽細胞の増殖を促進させるだけでなく分化をも促進するという報告⁸⁻¹⁰⁾がなされている。LIUSが及ぼす筋細胞への影響についても調査され、LIUSが筋芽細胞の増殖を促進させることが報告されている¹¹⁾。このように、非生理的な力学刺激が細胞に与える影響が調査されており、生理的な力学刺激^{12,13)}だけでなく非生理的な力学刺激¹⁴⁻¹⁸⁾もまた細胞の機械的情報変換と関係することが知られる。また、1 kHzの超音波よりも周波数が低い領域の微細振動が及ぼす細胞への影響を調査した研究がなされており、微細振動は細胞の接着や形状に影響を与えることが報告されている。更に、微細振動は培養液に含まれる分化誘導因子に働きかけることで神経細胞の分化促進を及ぼすという報告もなされている^{17,18)}。このように幅のある周波数領域における培養細胞への影響が調査され、細胞の代謝、増殖や分化に影響を与えることが明らかとなってきている。しかし、複数種の細胞に対して超音波刺激を付与した例は無く、様々な系における細胞の挙動変化を比較することは困難となっている。また、超音波振動刺激は、細胞の足場への接着や増殖・分化に影響を及ぼし、様々な細胞に対する影響を調査することで、新たな細胞培養方法の開発が期待できる。そこで、本研究では筋芽細胞、骨芽細胞、繊維芽細胞、神経芽細胞、血管内皮細胞の5種類の細胞を対象として、超音波振動 (LIUS) を1日30分間付与しながら培養し、超音波振動の強度の差が及ぼす細胞増殖挙動への影響を調査し、評価することを目的とした。組織培養用6ウェルプレートを用いて細胞を培養し、振動源から細胞培養面の距離が遠くなるにつれて振動強度が低下する実験系を用いて実験後の細胞の数と振動の強度の関係を調査した。更に、2章で述べた足場凹凸形状 (マイクロパターン) を足場に組み込み、細胞の試料の形状を制御した状態で超音波刺激を負荷し、振動するマイクロパターン上の細胞挙動について検討を行った。

4.2 実験方法

4.2.1 実験装置の構成

本実験では細胞培養底面に超音波振動子を設置し、培養容器の外側から1 MHzの超音波振動を付与することで培養底面を介して細胞に超音波刺激を付与した。実験では細胞を3日間培養し、超音波振動を1日に30分間、合計3回付与した。超音波振動が及ぼす細胞増殖への影響は、4日間培養を行った試料の細胞数を測定することで評価した。実験には6ウェルプレート(6-well Tissue culture plate, Corning)を2枚使い、図4.1に示すように、刺激が付与される1-6番のウェルプレートと静置培養を行うウェルプレートを用いた。超音波振動の周波数は1 MHzとし、超音波の発振源として piezo 超音波振動素子 (1Z28D-SYX, 富士セラミックス) を用いた。超音波振動子はφ28 mm, 厚さ1 mmの円板形状をしており振動モードは厚み方向への縦効果振動子を用いた。超音波振動子を1番のウェル底面(図4.1の1番の位置)に超音波治療用ゲルパッド(ソナゲルS, タキロン株式会社)を介して密着させ、ファンクションジェネレータ(WS8102型, Tabor Electronics Ltd.)を用いて周波数1 MHzの正弦波形状, 16 Vp-p (peak-to-peak)の信号を送ることで超音波振動子を駆動した(図4.2)。6-ウェルプレート及び、超音波ゲルパッド, 振動子はインキュベータ内(37°C, 5%-CO₂)に設置した(図4.3)。

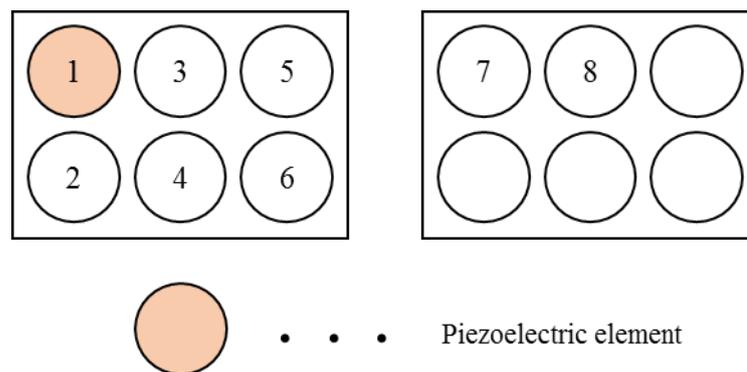


図4.1 各ウェルに割り振られた番号.

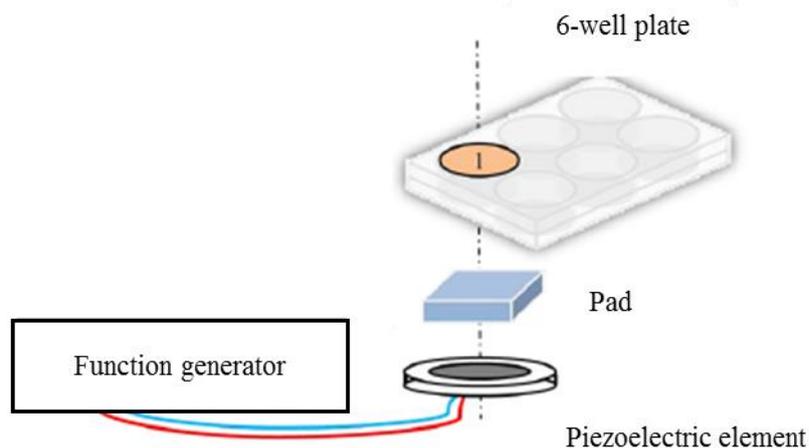


図 4.2 実験装置概要.

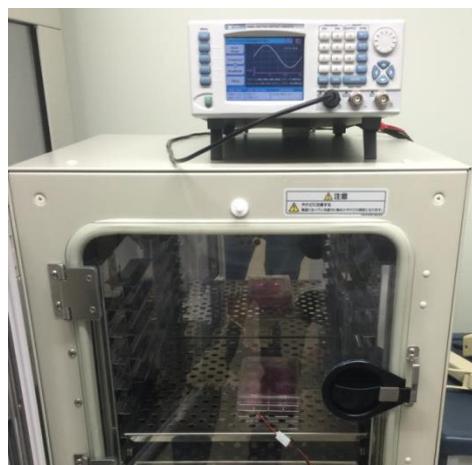


図 4.3 実験時における超音波振動の設置.

超音波振動する足場凹凸形状を有する培養面は、2章に記述したフォトリソグラフィ技術を用い、PDMS基板に足場凹凸形状を転写して作製した²⁾。足場凹凸形状は、ラインアンドスペース形状であり、高さ H 及び凹部分の幅はそれぞれ $1\ \mu\text{m}$ 、 $3\ \mu\text{m}$ とし、凸部分の幅を 1 、 3 、 $5\ \mu\text{m}$ と異なる、A、B、Cの面を用意し、細胞の接着の面積が変化するようにした。更に、Controlとして同じ面積の未加工面 (Control) を用意した。凹凸を有する面は $500 \times 500\ \mu\text{m}$ の範囲に作製し、図 4.4 のように並べて設置することで、顕微鏡視野内で同時に観察できるように設計した。図 4 はモールドの寸法を表しており、図中 A、B、C は PDMS 剥離用のパリレン膜 ($1\ \mu\text{m}$ 厚) を考慮した値を示す。細胞培養を行うにあたり、内径 $33\ \text{mm}$ 、外径 $50\ \text{mm}$ 、高さ $5\ \text{mm}$ の PDMS 製のリングを作製し、足場凹凸形状を有する基板上に設置した。また、振動中の振動子の位置の固定や培養基板

のたわみを抑制するために、PDMS を用いて超音波振動子を固定するためのホルダを作製した。超音波振動している細胞の様子を観察する為、内径 10 mm、外径 20 mm、厚さ 2 mm のドーナツ形状をした縦効果振動子 (1Z10x20W-SYX (C-21), 富士セラミックス) を用いた (図 4.5)。超音波振動子の共振周波数は 1MHz であり、ファンクションジェネレータを用いて $16 V_{p-p}$ 、サイン波で駆動した。PDMS 製培養容器及び、超音波ゲルパッド、振動子はインキュベータ内 ($37^{\circ}C$, 5%- CO_2) に設置した (図 4.6)。

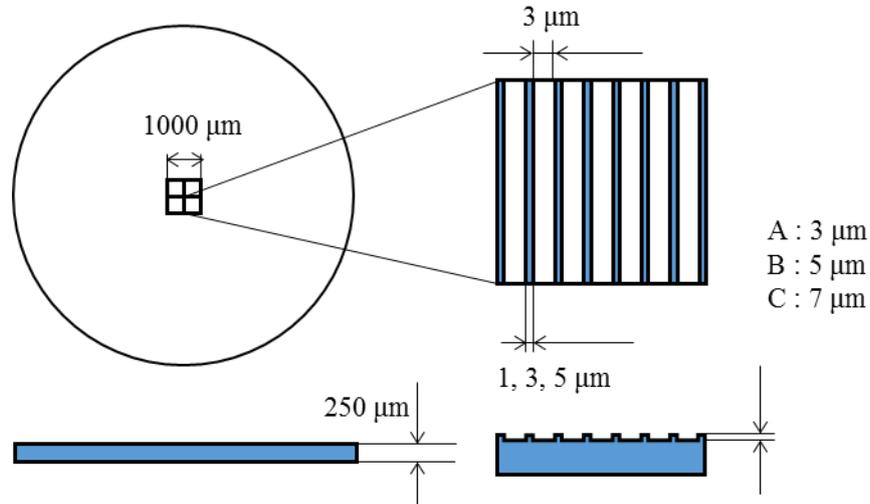


図 4.4 足場凹凸形状.

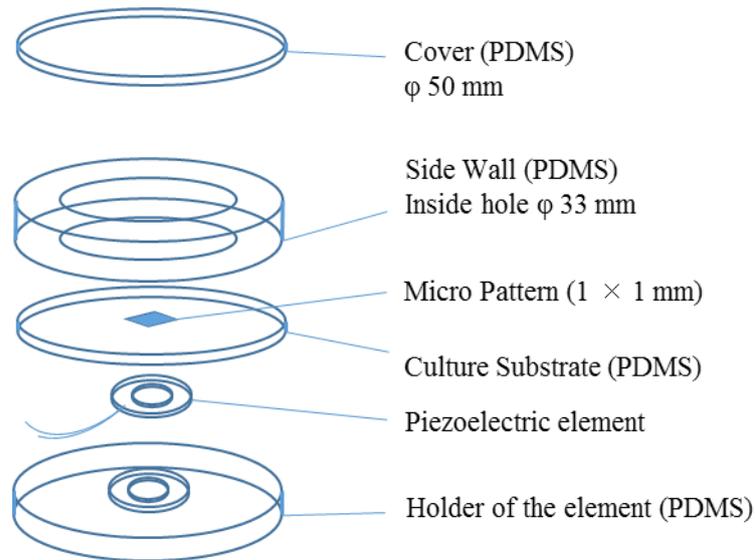


図 4.5 培養容器及び超音波振動子.

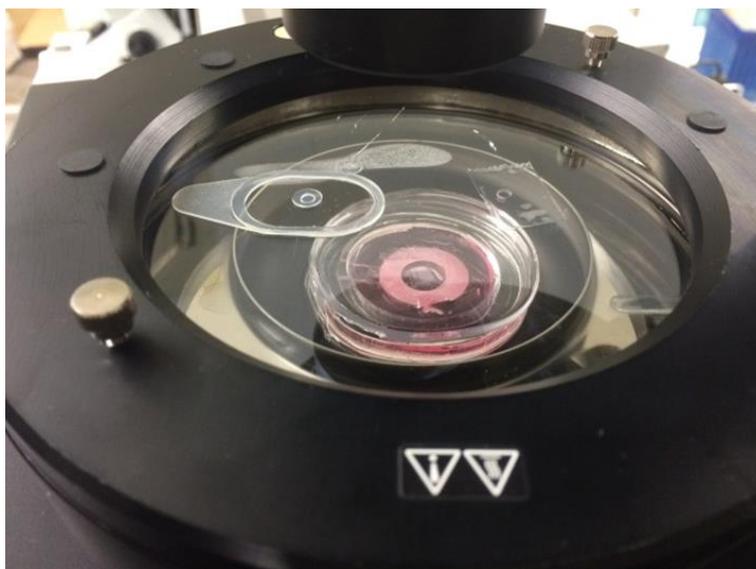


図 4.6 小型インキュベータ内に設置された培養容器及び振動子.

4.2.2 超音波振動強度の測定

超音波強度は超音波テスタ (TYPE-B SSP-2012, 超音波システム研究所) を用い, プローブの圧電効果を利用して測定した (図 4.7, 4.8). 6 ウェルプレートにおけるウェル同士の距離 [m] による減衰量を測定するため, 6 ウェルプレートに 5 ml の超純水を入れ, 各ウェルの中心位置で測定を行った. プローブに伝わるシグナルは電圧に変換され, 各ウェルにおける超音波振動強度 [mW/cm^2] は, 各ウェルで得られた電圧値の倍率 [dB] から計算し評価した. 超音波刺激を細胞に負荷する前に, 超音波刺激の大きさをあらかじめ測定した. 超音波振動子の出力は P [W] は式 (1) を用いて計算した.

$$P = V \cdot I \quad (1)$$

この時, P を超音波振動子の出力 [W], V を印加電圧 [V], I を回路に流れる電流 [A] とした. 超音波振動強度 D [W/cm^2] は式 (2) を用いて算出した.

$$D = \frac{P}{A} \quad (2)$$

この時、強度 D [W/cm^2] は、出力 P [W] を超音波振動子の面積 A [cm^2] で除した値とした。実験時の超音波振動子駆動回路に流れる電流の測定のために抵抗値が既知のカーボン抵抗 R (50.3Ω) を、ファンクションジェネレータ端子と振動子の間に挿入した回路を使用した。セラミック振動子は使用時の温度により特性が変化するため、実験時と同様にインキュベータ内 (37°C) で測定を行った。周波数： 1 [MHz]、設定電圧： 16 [Vp-p] の正弦波での条件抵抗 R の両端電圧 V はオシロスコープ (ViewGo, 岩通計測株式会社) を用いて計測し、回路に流れる電流 I は式 (3) を用いて算出した。

$$V = R \cdot I \quad (3)$$

この時、 V は電圧 [V]、 R は既知の抵抗値 [Ω]、 I は回路に流れる電流 [A] である。超音波振動子両端電圧の実効値を、実験時の超音波振動子に加えられた電圧の値とした。計算した電流 I と超音波振動子両端電圧を用いて、駆動時における振動子の抵抗値 R_2 を算出した。算出した抵抗値と実験用の回路における超音波振動子両端電圧の実効値を用いて回路に流れる電流を計算し、実験時の超音波強度 $D = 65$ [mW/cm^2] を得た。

各ウェルに加わる超音波強度の変化を測定するため、超音波テスト (TYPE-B SSP-2012, 超音波システム研究所) を用いて各ウェル内に伝わる超音波振動強度をプローブの圧電効果から電圧として計測し、計測値の倍率から超音波振動子を設置したウェルでの計測電圧を基準として各ウェル内での超音波強度を計算した (表 4.1)。

表 4.1 各ウェルにおける超音波刺激の強度 [mW/cm^2].

Well	Distance [mm]	Level [dB]	Power [W/cm^2]
1	0	0	0.065
2	39	-13	0.015
3	39	-10	0.021
4	55	-14	0.013
5	78	-43	0.0005
6	89	-33	0.0015

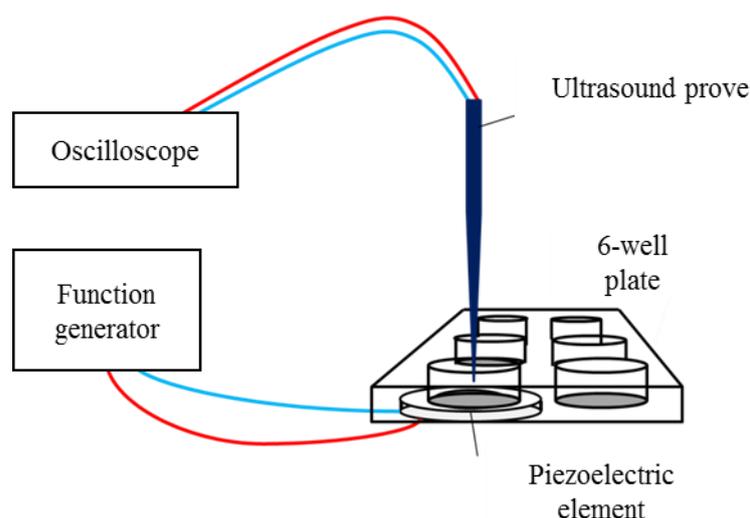


図 4.7 超音波テストを用いた振動強度の測定.

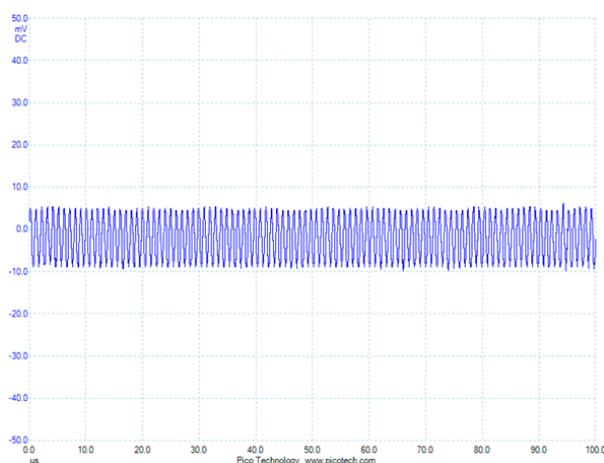


図 4.8 超音波振動の測定例.

4.2.3 細胞培養

本研究では筋、線維、骨、神経、血管内皮の 5 種類の由来を持つ細胞を用いた。マウス横紋筋由来筋芽細胞 (C2C12, DS ファーマバイオメディカル株式会社), マウス結合組織由来繊維芽細胞 (L929, DS ファーマバイオメディカル株式会社), マウス骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1, DS ファーマバイオメディカル株式会社), マウス神経芽細胞 (Neuro-2a, DS ファーマバイオメディカル株式会社), ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC, ロンザジャパン株式会社) をそれぞれサブコンフルエント状態で継代して実験に使用した。C2C12, L929, の培養には 10% ウシ胎児血清 (Fatal Bovine Serum, Sigma-aldrich) と 1% 抗生物質 (penicillin-Streptomycin (100,000 U/mL), Thermo Fisher Scientific)を含む DMEM 培地 (Dalbeco's modified eagle medium, Thermo Fisher Scientific) の培養液を用い, MC3T3-E1 の培養には α -MEM 培地に 10% ウシ胎児血清と 1%-抗生物質を添加した培地

を用いた。HUVECの培養には微小血管内皮細胞用培地 (EGMTM-2MV BulletKit™, ロンザジャパン株式会社) を用いた。各細胞の実験開始時の細胞密度は 1000 cells/cm² とし, CO₂ インキュベータ (MCO-20AIC, パナソニック) 内, 37°C, 湿度約 100%, 5%-CO₂, 95%-Air 環境で培養及び刺激の付与を行った。実験には継代数が 10 以下の細胞を用いた。培地交換は全ての細胞で 2 日に 1 回行い, 超音波振動後の培地交換による細胞の剥離が考えられたので, 播種後 2 日目の培地交換は超音波振動付与直前に行った。

4.2.4 評価方法

細胞の数は吸光度を用いて測定した。3 回目の振動付与が終了してから 24 時間後にトリプシン (0.25% Trypsin-EDTA, Gibco) 処理をし, 6 ウェルプレートから各ウェル内の細胞を回収し, Cell Counting Kit-8 (CCK-8, 同仁化学研究所) を用いてノントリートメント 96 ウェルプレート (96-well non-Tissue culture plate, Corning) 内に CCK-8 量が 1/10 となるように添加した。作製した試料は 150 分間インキュベータ内に静置し, 450 nm フィルタを通した吸光度計 (Multiskan FC, Thermo Scientific) を用いて各種細胞で 1 回ずつ測定した。測定した吸光度から, 予め測定した細胞数と吸光度の比例グラフを用いて細胞数を計算した, この値を, それぞれのウェル内における細胞数とした。図 4.9~4.13 に各細胞種における吸光度と細胞数の関係を示す。ウェル内における細胞全体の様子を観察するために, 実験同様の方法で 3 日間培養した C2C12 に対して各ウェルに 2 ml のメタノールを用いて 30 秒間固定処理し, ギムザ染色液 (ギムザ染色液, 和光純薬) を超純水 1 ml に 1 滴滴下して調整した染色液 2 ml で 30 分間の染色を行った。

Neuro2a の分化に対する超音波刺激の影響は, 画像解析ソフト Image-J を用いて解析した。細胞の分化の評価は, 超音波刺激負荷後の細胞の位相差観察画像上で神経突起の形状を追従し, 神経突起の長さを測定することで評価した。図 4.14 に解析時の画像を示す。黄色線の部分は細胞が神経突起を表しており, 観察視野内における神経突起の長さの合計を用いて分化の評価を行った。

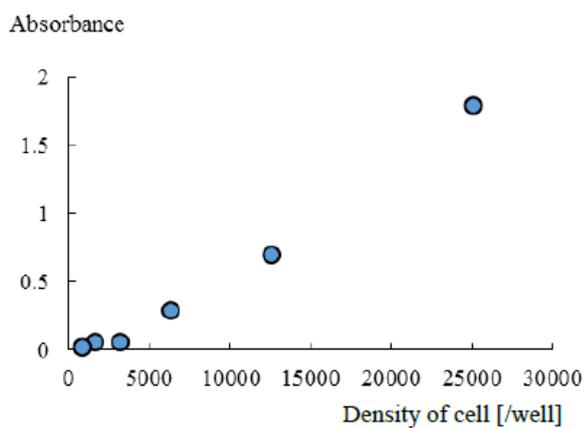


図 4.9 C2C12 の吸光度と細胞の濃度の関係.

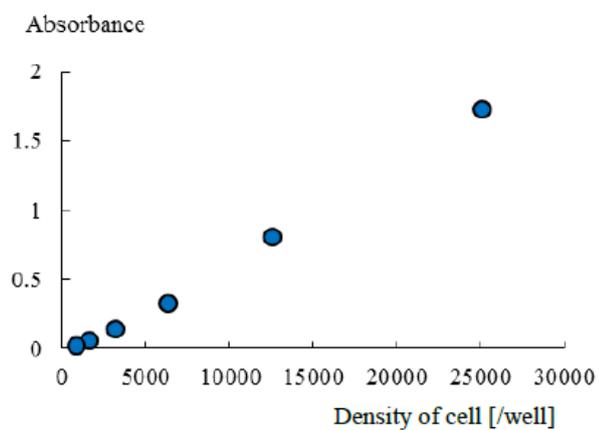


図 4.10 L929 の吸光度と細胞の濃度の関係.

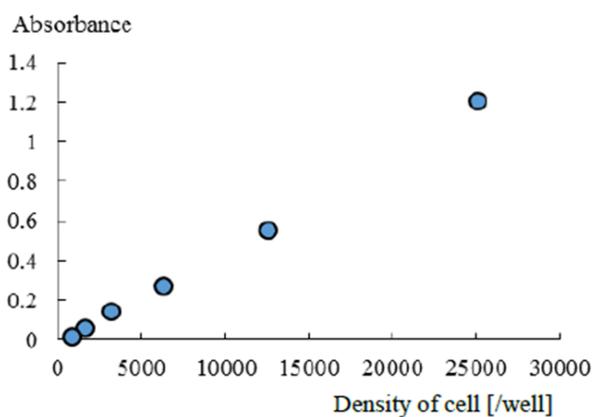


図 4.11 Hepa1-6 の吸光度と細胞の濃度の関係.

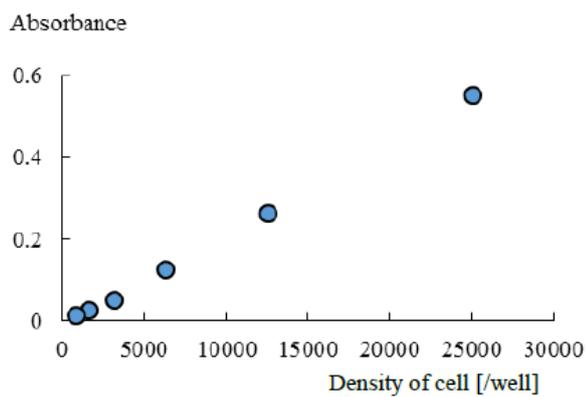


図 4.12 HUVEC の吸光度と細胞の濃度の関係.

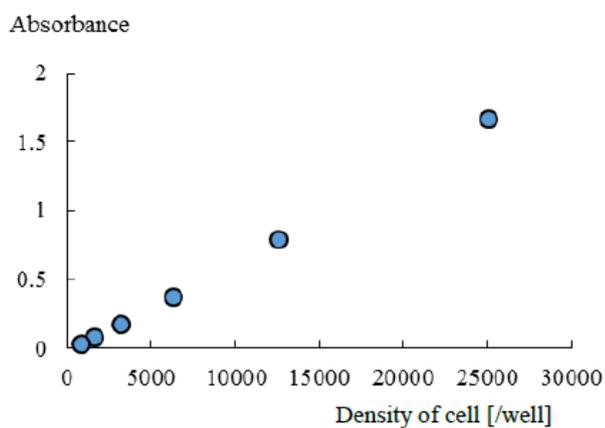


図 4.13 Neuro2a の吸光度と細胞の濃度の関係.

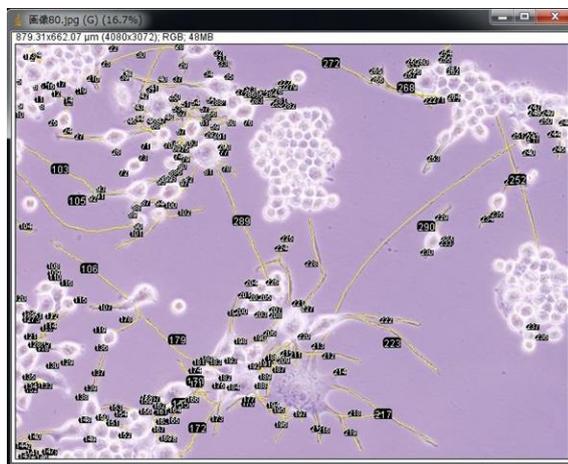


図 4.14 神経突起の長さの測定.

4.3 実験結果

超音波振動刺激が及ぼす細胞の増殖，分化に与える影響について既述する．図 4.15A, B に，培養 1 日目における超音波刺激 30 間負荷後の C2C12 (A)，Neuro2a (B) の様子を示す．30 分間の超音波刺激直後の細胞には変化が見られず，細胞の由来に関わらず伸展し，培養基板に接着している様子が観察できた．図 4.16 に，培養 3 日目における C2C12 の組織染色画像を示す．A に，振動子を設置した培養容器内の様子 (Well 1) を示す．3 日間断続的に最も強い超音波振動刺激 (65 mW/cm^2) を負荷した C2C12 は，肉眼で観察できる程，細胞組織が剥離している様子が観察された．B に，隣接する培養容器内 (Well 4) の組織染色画像を示す．中程度の長音音波振動刺激 ($13 \sim 15 \text{ mW/cm}^2$) を負荷した C2C12 では，細胞組織の剥離は見られなかった．図 4.17～図 4.21 に，3 日間の培養後の細胞の数と超音波刺激の強度の関係を示す．細胞数 9600 は 1000 cells/cm^2 の細胞密度に相当する．図 4.17 に，C2C12 の細胞数の測定結果を示す．図 4.16 に示したように細胞の剥離が見られ， 65 mW/cm^2 の超音波強度では，細胞数が少なくなった．図 4.18 に，L929 の測定結果を示す．L929 では，超音波強度の違いによる細胞数の変化は見られず，HUVEC (図 4.20) も同様に細胞の数に変化は見られなかった．図 4.19 に，Hepa1-6 の測定結果を示す．Hepa1-6 では， 65 mW/cm^2 の超音波強度において細胞の数は減少し，Neuro2a (図 4.21) も同様に細胞の数は減少した．これらのことから，細胞の由来部位により超音波振動刺激に対する増殖の応答が異なることがわかった．超音波振動刺激が及ぼす，細胞の分化に対する応答について検討した．図 4.22 に，分化した Neuro2a の例を示す (Well 2)．神経突起の伸展を観察することができ，Neuro2a の分化を確認した．図 4.23 に，各超音波振動刺激条件における，複数の観察画像内の神経突起の長さの合計を示す． 65 mW/cm^2 の超音波刺激条件では，神経突起が長くなる傾向があった．

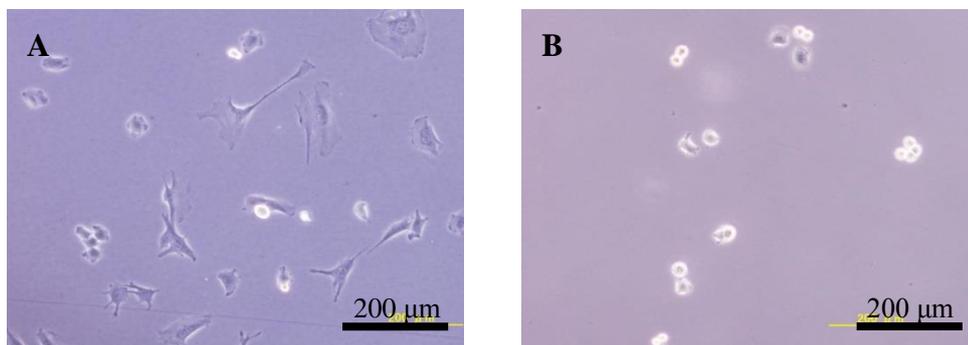


図 4.15 超音波刺激負荷後の C2C12.

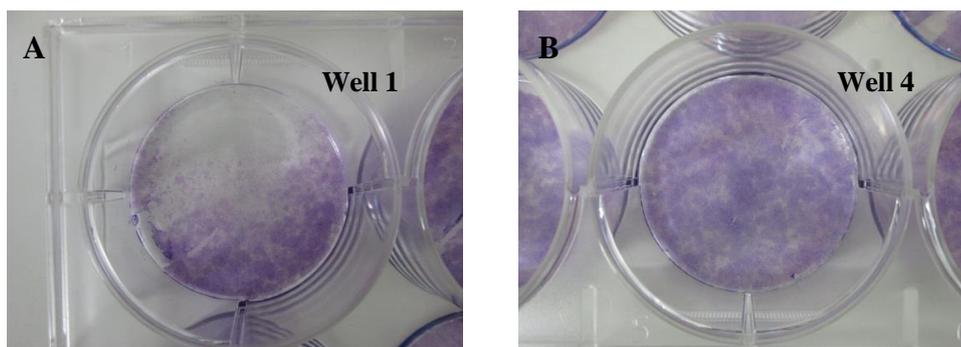


図 4.16 超音波刺激負荷後のギムザ染色画像 (C2C12).

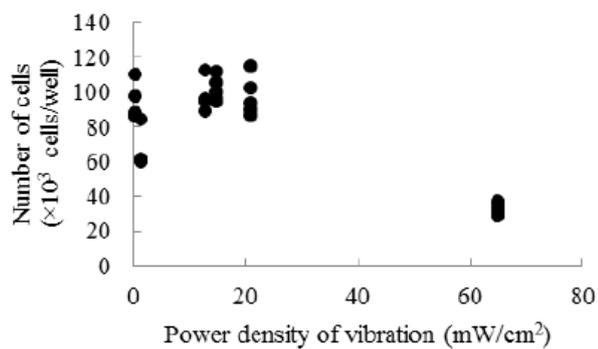


図 4.17 細胞数と振動強度の関係 (C2C12).

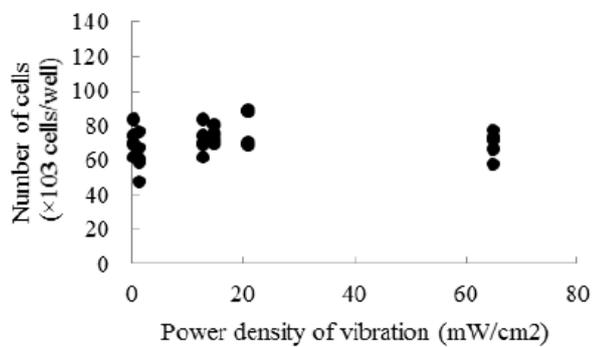


図 4.18 細胞数と振動強度の関係 (L929).

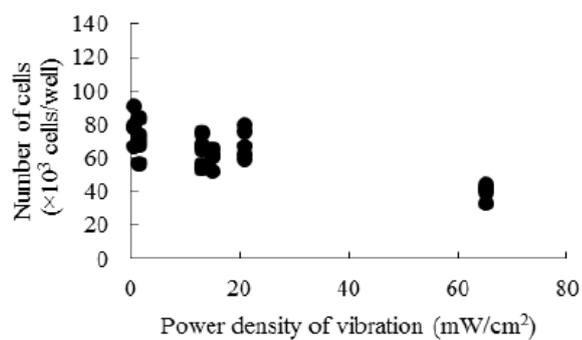


図 4.19 細胞数と振動強度の関係 (Hepa1-6).

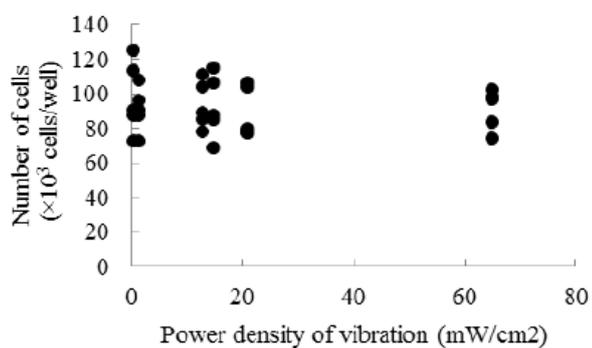


図 4.20 細胞数と振動強度の関係 (HUVEC).

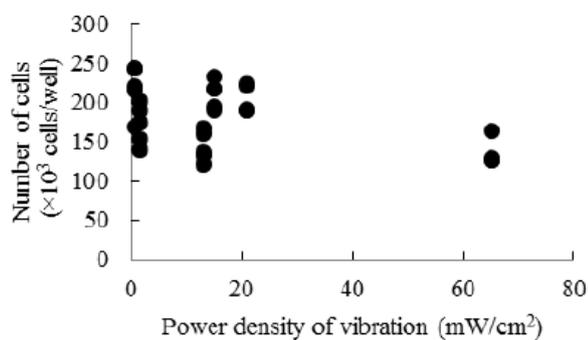


図 4.21 細胞数と振動強度の関係 (Neuro-2a).

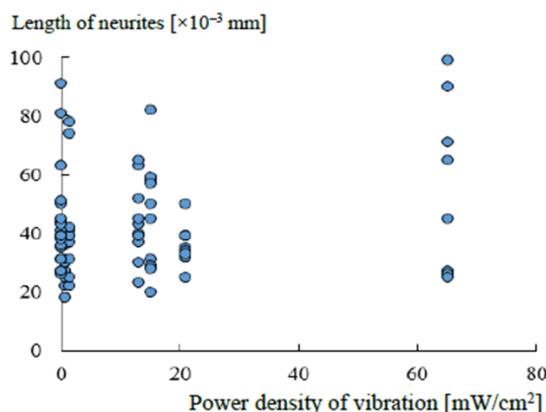


図 4.22 Neuro-2a の神経突起の長さとの振動強度の関係。
観察画像から得られた神経突起の総長さ

次に、振動する微細加工表面上の細胞の挙動について記述する。超音波振動刺激実験に用いた足場の凹凸形状はレーザ顕微鏡で測定した。図 4.23 に Si モールドの測定結果を示す。足場凹凸形状はパターンの走行方向の対角線方向に測定し、表 4.2 に結果をまとめた。図 4.24 に SEM による Si モールド上の凹凸形状の観察画像を示す。異なる間隔のパターンが作製できたことを確認した。

振動する足場上の細胞の例を図 4.25A-D に示す。本実験では、C2C12, 3T3-L1, Hepa1-6, L929 細胞に超音波刺激を負荷しながら 3 時間培養した。図中の y 方向の矢印はパターンの方向を示しており、4 つの領域に別れた領域の左上が未加工の面 (Control) である。図 4.25A は振動する足場上での C2C12 の挙動を示す。超音波振動環境において細胞は基板の凸部への接着を保ち、伸展と退縮を繰り返しながらパターンの方向に遊走する様子が観察された。Control 面では、細胞が剥離する様子が観察できた。凹凸形状の間隔が狭いパターン上 (1,3 μm) の細胞の遊走する速度は、幅 = 5 μm のパターンと比較して速く、特に、1 μm 幅では、振動が影響を与えている傾向があった。図 4.25B は 3T3-L1 の挙動の例をしめす。3T3-L1 は他の細胞と比較して基板へ接着している細胞の数は少なかった。3T3-L1 では、Control の領域に接着する時間が最も短く、パターン上への接着よりも早く接着していた。また、3T3-L1 では、伸展方向はパターンの方向に従わなかった。図 4.25C は Hepa1-6 の挙動を示す。3 時間の超音波刺激後の細胞は、形状が円に近く、基板への接着による変形の区別が難しかった。超音波刺激により、幅の広いパターン上の細胞数は減少した。振動中に剥離した細胞は接着しなかった。Hepa1-6 もまた、仮足の伸展と退縮を繰り返すが、仮足の伸展方向はパターン方向の影響を受けなかった。また、超音波振動刺激は細胞の遊走挙動を減少させた。図 4.25D は L929 の挙動を示す。L929 は、播種後 1 時間で足場への接着、伸展する様子が確認できた。また、パターン方向への遊走は観察できなかった。図 4.26, 28 に、3 時間の超音波刺激下における C2C12, L929 の遊走軌跡の例を示す。足場凹凸形状上における細胞の位置は、細胞の輪郭から算出された重心座標とし、測定開始時の位置をグラフの原点として 10 分毎の移動を表示し

た. グラフの x 軸と y 軸は, 基板のパターン方向と対応しており, y 軸がパターンの方向, x 軸がパターンを横断する方向を示している. 図 4.26 に, C2C12 の遊走軌跡を示す. C2C12 では, 遊走方向がパターンの方向となった. 図 4.27 に, L929 の遊走軌跡を示す. L929 は, ランダムな方向に遊走し, 軌跡の広がりから遊走量は L929 よりも C2C12 の方が大きいことが分かった. 図 4.28 に, 図 4.26, 27 における細胞のパターン方向への移動量 Δy とパターンを横断する方向への移動量 Δx との比 (遊走比) を示した. 遊走比が 1 よりも大きい場合は, パターン方向への移動が大きいことを意味する. C2C12 は最も比の値が大きく, パターン方向への遊走量が大きいことがわかった. 表 4.3 は細胞の長軸方向とパターンの方向がなす角度が 10° 以下となる細胞の数を示す. 細胞の増殖や遊走により, 測定範囲における細胞数が増加した. また, 細胞の数は超音波による剥離だけでなく, 遊走により測定範囲外に移動することで変化した.

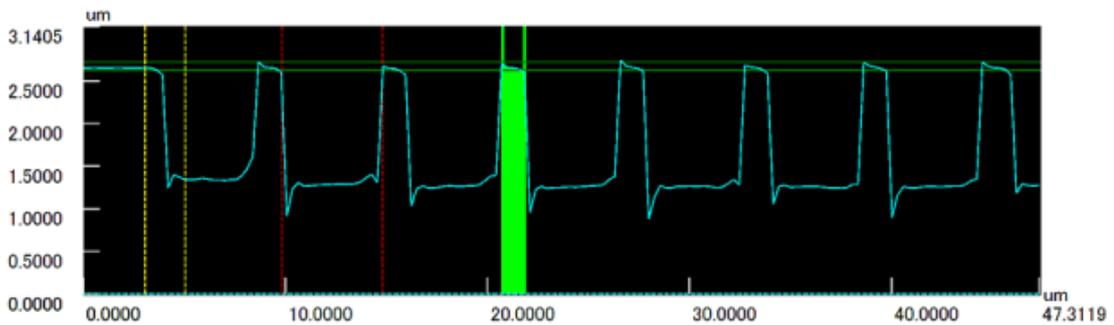


図 4.23 レーザ顕微鏡による Si モールドの断面形状.

表 4.2 レーザ顕微鏡による Si モールドの測定結果.

Group	mm		
	Depth	Width	Interval
A	0.0012	0.001	0.0028
B	0.0013	0.001	0.0049
C	0.0013	0.001	0.0069

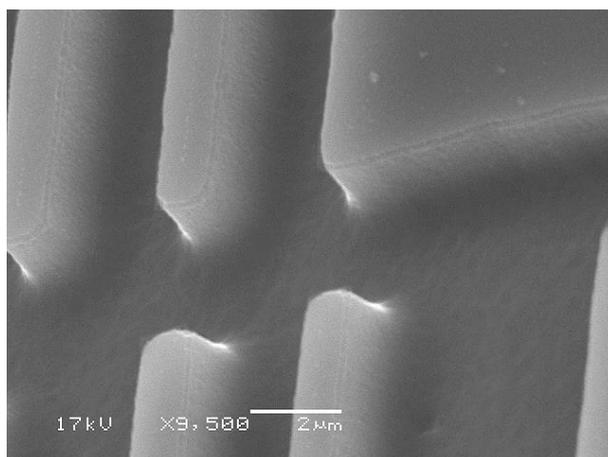


図 4.24 足場凹凸形状の SEM 画像.

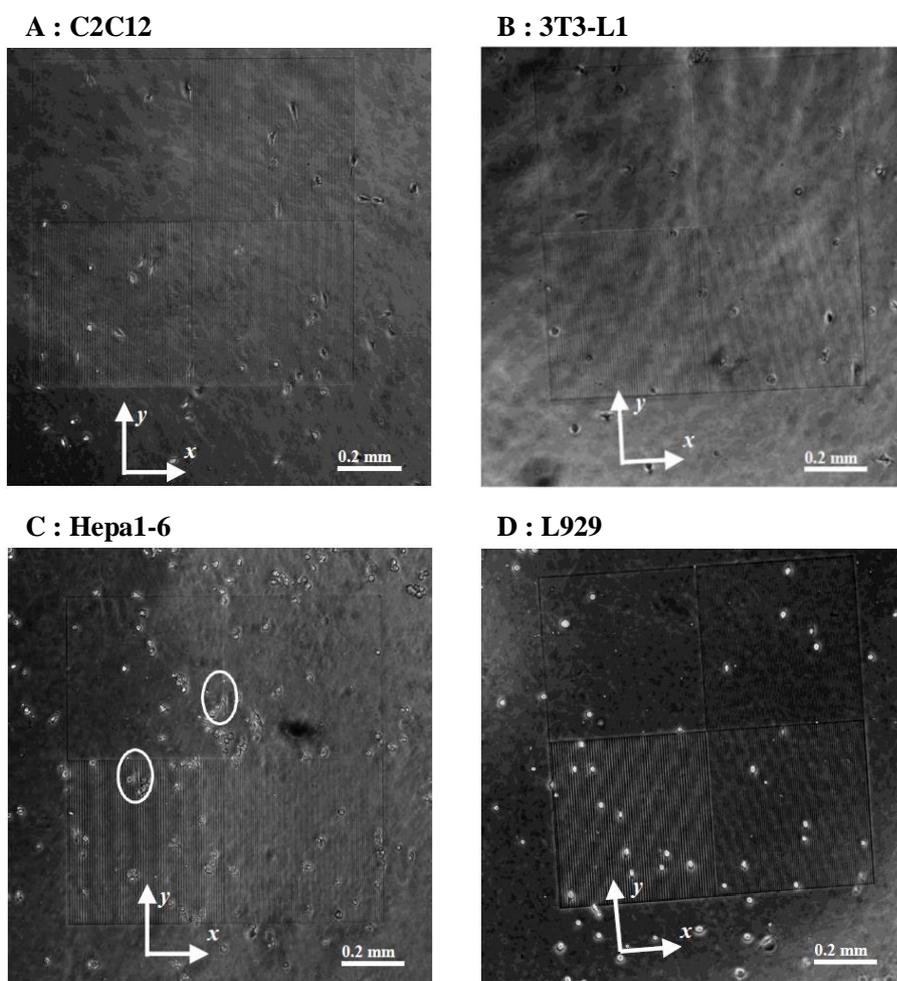


図 4.25 超音波振動を 3 時間負荷後の各細胞 (C2C12, 3T3-L1, Hepa1-6, L929).

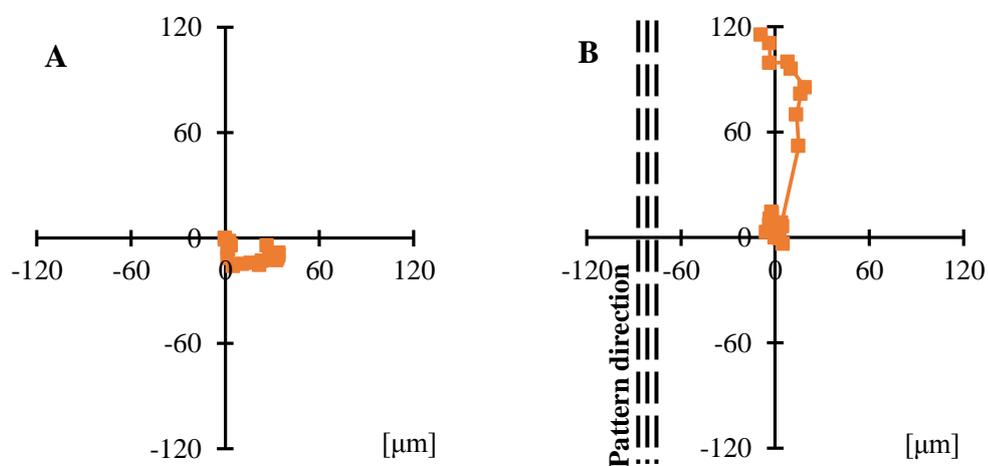


図 4.26 振動する幅 3 μm のマイクロパターン上で 3 時間培養した時の C2C12 の挙動.

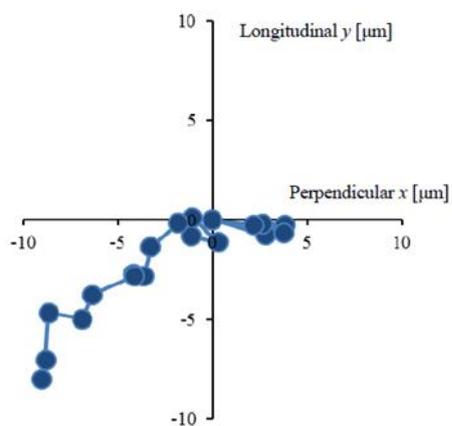


図 4.27 振動する幅 1 μm のマイクロパターン上で 3 時間培養した時の L929 の挙動例.

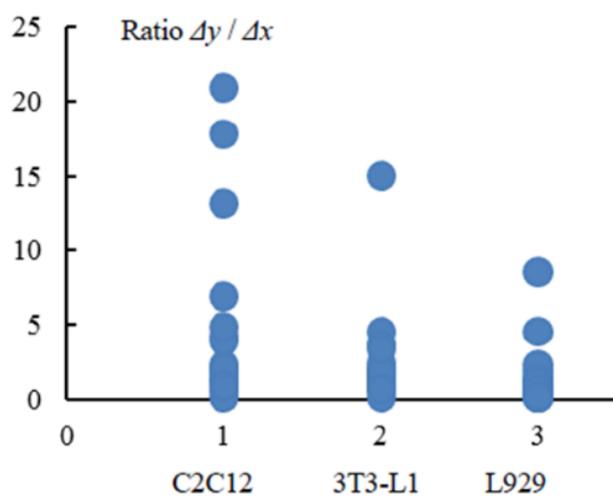


図 4.28 幅 $3 \mu\text{m}$ のマイクロパターン上での細胞の遊走方向の比.

表 4.3 各領域において配向している細胞/接着している細胞の数.

C2C12	Flat	Width of ridge [mm]		
		0.001	0.003	0.005
3 h	0/3	1/7	2/9	0/8
+3 h vib	0/4	3/6	2/9	5/7

3T3-L1	Flat	Width of ridge [mm]		
		0.001	0.003	0.005
3 h	0/4	0/4	0/9	0/5
+3 h vib	0/5	0/3	1/5	0/5
+24 h	2/8	5/8	3/7	3/12

Hepa1-6	Flat	Width of ridge [mm]		
		0.001	0.003	0.005
1 h	0/35	0/33	0/13	0/14
+24 h vib	0/19	1/26	0/20	1/35
+24 h	0/14	5/14	0/23	0/18

L929	Flat	Width of ridge [mm]		
		0.001	0.003	0.005
3 h	0/5	0/5	0/9	0/14
+3 h vib	0/4	0/5	1/10	0/12

4.4 考察

本実験では超音波振動刺激を培養実験に組み込むことで、1日に30分間の1MHzの超音波振動が培養細胞に与える影響を調査した。また、超音波振動とラインアンドスペース形状の微細加工を組み合わせた実験系を用いて、機械的刺激負荷時における細胞の足場応答への影響について調査した。様々な種類の細胞を用いることで、細胞の由来により応答が異なることを見出し、特に接着や増殖は、超音波強度の影響を受けることがわかったことや、微細加工表面上の細胞の挙動に超音波振動刺激が影響を与えることが分かった。

超音波刺激を断続的に負荷しながら、細胞培養することにより、超音波刺激が細胞の増殖、分化の促進効果を有することを示した。これまでに、機械的な刺激は、細胞の増殖に影響を与えることが知られている¹¹⁾。本研究では、5種類の異なる細胞に対して実験を行い、超音波刺激の影響は、細胞の種類によって異なることを示せた点は、本実験の優位な点であると言える。本実験装置における細胞増殖促進効果の原因として、超音波振動による細胞の微細な繰返し伸展刺激、培養液の流動による流体刺激(図4.30)、あるいは、温熱効果による熱刺激による機械的情報変換¹²⁻¹⁸⁾による成長、分化因子の分泌や、培養液の攪拌による影響供給が挙げられる。本研究で用いた振動では、培養液の温度は約37°Cであることをサーモグラフィによって確かめた。このことから、刺激装置内の環境は生理的であり、細胞の増殖に影響を及ぼさないと考えられる。また、染色液を用いて培養容器内の流動の様子を可視化したところ、1番の培養容器内では、染色液の中央に色の空間が発生したが、隣接する培養容器内においては見られず、流動や攪拌は観察できなかった。そのため、2, 3, 4番のウェルにおける細胞の増殖促進への効果は、超音波刺激が原因であると考えられる。上記の結果から、細胞の増殖、分化に及ぼす促進効果は、超音波振動による、微細な繰返し伸展様の刺激が原因であると推測できる。

65 mW/cm²の強い超音波振動刺激は、細胞組織の剥離を誘発した(図4.16)。培養1日目、及び2日目における、超音波刺激直後の観察画像から、細胞の剥離は確認できなかったため、超音波振動刺激による組織の剥離には、細胞間の接着が関係していると考えられる。すなわち、細胞同士が接着し、組織化することで超音波刺激が大きく影響を与えている。1MHzの周波数で振動し、培養液中の音速を1500 m/sとして計算した場合、波長は1.5 mmに相当するため、浮遊時、接着時の細胞の直径、長軸長さよりも50倍以上大きい。そのため、細胞間に空隙が存在する培養1, 2日目には、剥離が観察できなかったと考えられる。一方、集密状態まで増殖した培養3日目では、細胞同士の接着が強固になり、波長よりも大きな組織を構成したことで、細胞の剥離が誘発されたと考えられる。

20 mW/cm²前後の超音波振動が細胞の増殖に影響を与え、増殖促進の効果を有することがわかった。また、細胞の増殖速度は細胞の密度にも依存するため¹⁹⁾、本研究では厳格に実験開始時の細胞の密度を制御した。現在の超音波振動培養装置では、超音波診断用のゲルや、培養用のポリスチレン容器による振動の減衰や、超音波振動が各部材の境界面での反射が原因となって、細胞に加わる振動の強度が65 mW/cm²よりも小さい可能性がある。しかし、本研究では、細胞の応答が示される超音波振動強度の閾値を定量化することには無理があっても、超音波振動が与える細胞の増殖に関しては、界面での反射・足場材料による減衰が、実験結果に与える影響は限定的で

あると考えられる。

超音波振動する微細加工表面上の細胞は、静置培養直後では、細胞の種類ごとに異なる配向を観察することができた。特に、Hepa1-6は基板への伸展が見られず、おおよそ全ての細胞が丸に近い形状であった。本実験では、 $1\ \mu\text{m}$ の高さを有する足場凹凸形状を用いた。第2章の結果と比較すると、C2C12はパターンの方に配向する傾向を確認することができ、 $0.7\ \mu\text{m}$ 以上の高さを有するパターン上では、パターン方向への配向を示すという結果を裏付ける結果となり、更に、異なる間隔を有するパターンに対する複数種類の細胞の応答を検討できた。超音波振動刺激後のパターン上における細胞は、配向を示す傾向が強まることわかった²⁰⁾(表4.3)。本研究では、細胞培養時間を短くし、細胞が伸展する様子から、超音波振動刺激が細胞の配向に与える影響について検討し、細胞の配向に超音波刺激が影響を与えることが分かった。これは、微細な振動が沈降する未接着の細胞、及び接着初期における細胞の位置をパターンへの凹部に移動したためであると考えられる。つまり、超音波振動刺激は細胞の接着位置に影響を与えると考えられる。

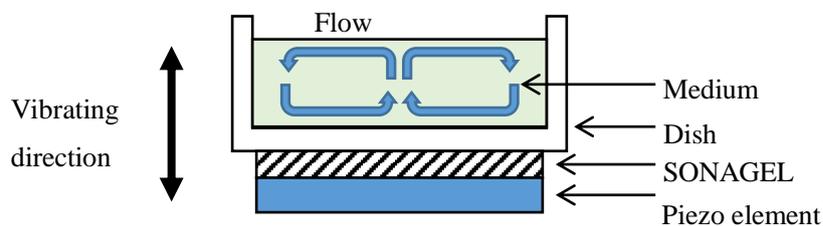


図 4.29 超音波振動時における培養環境。

4.5 結 言

1.0 MHz の超音波振動刺激を、C2C12, L929, Hepa1-6, HUVEC, Neuro2a の5つの細胞に対して負荷し、生体外で超音波刺激が及ぼす細胞の増殖に対する応答について検討した。その結果、細胞の増殖や分化は中程度の超音波刺激により促進され、超音波刺激に対する応答は細胞の種類によって異なることが分かった。また、振動する凹凸上の細胞について検討した。実験に用いた4種類の細胞は振動の有無に関わらず、基板上に接着し、変形や移動の挙動が見られた。振動する基板上的挙動は細胞の種類に依存して変化していることが分かった。

参考文献

1. H. Hino, S. Hashimoto, Y. Takahashi and H. Nakajima, "Effect of Ultrasonic Vibration on Proliferation of Cells", *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol.14, No.6, 2016, pp.1-7.
2. H. Hino, S. Hashimoto, S. Nishino, H. Nakajima, Y. Takahashi and H. Sugimoto, "Behavior of Cell on Vibrating Micro Ridges", *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol.13, No.3, 2015, pp. 9-16.
3. S.R. Angle, K. Sena, D.R. Sumner and A.S. Viridi, "Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells by Various Intensities of Low-intensity Pulsed Ultrasound", *Ultrasonics*, Vol.51, No.3, 2011, pp.281-288.
4. A. Khanna, R.T.C. Nelmes, N. Gougoulas, N. Maffulli and J. Gray, "The Effects of LIPUS on Soft-tissue Healing: a Review of Literature", *British Medical Bulletin*, Vol.89, No.1, 2009, pp.169-182.
5. A. Suzuki, T. Takayama, N. Suzuki, M. Sato, T. Fukuda and K. Ito, "Daily Low-intensity Pulsed Ultrasound-mediated Osteogenic Differentiation in Rat Osteoblasts", *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, Vol.41, No.2, 2009, pp.108-115.
6. W.J. Tyler, Y. Tufail, M. Finsterwald, M.L. Tauchmann, E.J. Olson and C. Majestic, "Remote Excitation of Neuronal Circuits Using Low-Intensity, Low-Frequency Ultrasound", *PLoS ONE Ultrasonic Neurostimulation*, Vol.3, No.10, 2008, 11 pages, e3511.
7. T. Takayama, N. Suzuki, K. Ikeda, T. Shimada, A. Suzuki, M. Maeno, K. Otsuka and K. Ito, "Low-intensity pulsed ultrasound stimulates osteogenic differentiation in ROS 17/2.8 cells", *Life Science*, Vol.80, Issue10, 2007, pp.965-971.
8. K. Ikeda, T. Takayama, N. Suzuki, K. Shimada, K. Otsuka and K. Ito, "Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells", *Life Science*, Vol.79, Issue.20, 2006, pp.1936-1943.
9. K. Sena, S.R. Angle, A. Kanaji, C. Aher, D.G. Karwo, D.R. Sumner and A.S. Viridi, "Low-intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) and Cell-to-cell Communication in Bone Marrow Stromal Cells", *Ultrasonics*, Vol.51, No.5, 2011, pp.639-644.
10. C.Z. Wang, G.J. Wang, M.L. Ho, Y.H. Wang, M.L. Yeh and C.H. Chen, "Low-magnitude Vertical Vibration Enhances Myotube Formation in C2C12 Myoblasts", *Journal of Applied Physiology*, Vol.109, No.3, 2010, pp.840-848.
11. H. Park, M.C. Yip, B. Chertok, J. Kost, J.B. Kobler, R. Langer and S.M. Zeitels, "Indirect Low-Intensity Ultrasonic Stimulation for Tissue Engineering", *Journal of Tissue Engineering*, Vol.2010, 2010, Article ID 973530, 9 pages.
12. S. Hashimoto and M. Okada, "Orientation of Cells Cultured in Vortex Flow with Swinging Plate in Vitro", *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol.9, No.3, 2011, pp.1-7.
13. S. Hashimoto, F. Sato, H. Hino, H. Fujie, H. Iwata and Y. Sakatani, "Responses of Cells to Flow in Vitro", *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol.11, No.5, 2013, pp.20-27.
14. S. Hashimoto and K. Tachibana, "Effect of Magnetic Field on Adhesion of Muscle Cells to Culture Plate", *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol.11, No.4, 2013, pp.7-12.

15. S. Hashimoto, F. Sato, R. Uemura and A. Nakajima, “Effect of Pulsatile Electric Field on Cultured Muscle Cells in Vitro”, *Journal of Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol.10, No.1, 2012, pp.1-6.
16. S. Hashimoto, H. Hino and T. Iwagawa, “Effect of Excess Gravitational Force on Cultured Myotubes in Vitro”, *Journal of Systemics, Cybernetics and Informatics*, Vol.11, No.3, 2013, pp.50-57.
17. Y. Ito, T. Kimura, Y. Ago, K. Nam, K. Hiraku, K. Miyazaki, T. Masuzawa and A. Kishida, “Nano-vibration effect on cell adhesion and its shape”, *Bio-medical Materials and Engineering*, Vol.21, No.3, 2011, pp.149-158.
18. Y. Ito, T. Kimura, K. Nam, A. Katoh, T. Masuzawa and A. Kishida, “Effect of Vibration on Differentiation of Cultured PC12 Cells”, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.108, No.3, 2010, pp.592-599.
19. H. Nakajima, H. Hino, S. Hashimoto, Y. Takahashi and T. Yasuda, “Effect of Ultrasonic Vibration on Proliferation of Cultured Cell”, *Proc. 19th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol.2, 2015, pp.276-281.
20. H. Sugimoto, H. Hino, Y. Takahashi, S. Hashimoto, “Effect of Surface Morphology of Scaffold with Lines of Micro Ridges on Deformation of Cells”, *Proc. 20th World Multi-Conference on Systemics Cybernetics and Informatics*, Vol. 2, 2016, pp. 135-140.

第5章 結論

本研究では、新たに設計・作製した機械的刺激デバイスを用いて、生物細胞の配向・増殖を *in vitro* において計測し、以下のような結論を得た。第2章「細胞の配向に対する培養足場凹凸形状の影響」では、マイクロ加工によって細胞の浮遊時の直径 ($20\ \mu\text{m}$ 前後) よりも小さな幅の凹凸縞模様を付与した足場に接着した細胞の応答を調べ、配向方向を制御するための足場の凹凸の高さの閾値を見出した。すなわち、高さが $0.7\ \mu\text{m}$ 未満になると C2C12 (マウス横紋筋由来筋芽細胞) は足場形状に対する配向を示さなくなる。第3章「細胞に対するせん断流れ刺激の影響」では、微小凹凸縞模様を伴う足場によってあらかじめ方向を制御した細胞に定量的にせん断流れ刺激を負荷する実験や、回転円板によるクエット流れ負荷装置における実験を行い、 $2\ \text{Pa}$ 以下の壁面せん断応力下で、筋芽細胞が流れの方向に対して斜め方向、骨芽細胞が流れと平行な方向に各々配向する様子を観察できた。第4章「細胞に対する超音波振動刺激の影響」では、持続的に $1\ \text{MHz}$ の超音波振動刺激を与えながら培養した実験において、細胞の接着・増殖・分化に対する影響が、細胞の種類毎に異なることを見出した。以上、本論文では、細胞の種類に応じて、足場凹凸形状および流れ・超音波振動などの機械的刺激の程度を調節することによって、細胞の挙動を制御できることを見出した。本研究の成果は、*in vitro* における細胞の組織化の効率を上げる手法の開発につながり、再生医療などの分野への貢献が期待される。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり，橋本成広教授には，学部時代から大変な苦勞をかけていただきましたが，ご指導ご鞭撻いただけたことに感謝しております．本論文の作成にあたり，ご指導と審査をいただいた，工学院大学 鈴木健司教授，伊藤慎一郎教授，今村保忠教授，首都大学東京 藤江裕道教授には，大変お世話になりました．深く感謝申し上げます．また，様々な面で支えていただいた工学院大学クリーンルーム管理室の皆様，関係者の皆様，そして，研究についてのみならず，様々な面でアドバイスを頂いた本学の先生方には大変感謝しております．

本論文の研究遂行にあたり，文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（工学院大学 FMS: Functional Microstructured Surface Research Center）の支援をいただきました．ここに記して謝意を表します．