慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	超音波技術を基盤としたシーケンシャル細胞培養システム
Sub Title	Sequential cell culture system mediated by ultrasonic technology
Author	竹村, 研治郎(Takemura, Kenjirō) Friend, James( )
Publisher	
Publication year	2019
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	再生医療などの細胞療法において細胞培養技術は重要な基盤技術である。本研究では、超音波技術を用いて自動細胞培養システムの基盤技術を確立することを目的とした。 はじめに、培養ディッシュに対して超音波振動を付与することによって底面に接着した細胞をタンパク質分解酵素を用いることなく剥離できることを明らかにした。つぎに、超音波ポンピングを応用して、振動する培養面の上方からガラス管を近接させることによって培養ディッシュ内の細胞懸濁液を回収する手法を確立した。さらに、培養ディッシュに対して、適切な振幅分布を持つ超音波を付与することによって、細胞をパターニングする技術を確立した。 Cell culture technology is an important technology in cell therapy such as regenerative medicine. In this study, we aimed to establish the basic technology of automated cell culture system using ultrasonic technology. First, it was clarified that cells attached to the bottom of culture dish can be detached without using any proteinase by applying ultrasonic vibration to culture dish. Next, ultrasonic pumping was applied to establish a method to recover the cell suspension in the culture dish by placing a glass tube close to the vibrating culture surface. Furthermore, by applying ultrasonic waves with appropriate amplitude distribution to culture dishes, we established a technology to pattern cells on a culture substrate.
Notes	研究種目：基盤研究 (B) (一般) 研究期間：2016～2018 課題番号：16H04259 研究分野：機械工学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_16H04259seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　　元 年　　５ 月 ３０ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｈ０４２５９

研究課題名（和文）超音波技術を基盤としたシーケンシャル細胞培養システム

研究課題名（英文）Sequential cell culture system mediated by ultrasonic technology

研究代表者
竹村　研治郎（Takemura, Kenjiro）

慶應義塾大学・理工学部（矢上）・教授

研究者番号：９０３４８８２１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：　再生医療などの細胞療法において細胞培養技術は重要な基盤技術である．本研究では，超音波技術を用いて自動細胞培養システムの基盤技術を確立することを目的とした．
　はじめに，培養ディッシュに対して超音波振動を付与することによって底面に接着した細胞をタンパク質分解酵素を用いることなく剥離できることを明らかにした．つぎに，超音波ポンピングを応用して，振動する培養面の上方からガラス管を近接させることによって培養ディッシュ内の細胞懸濁液を回収する手法を確立した．さらに，培養ディッシュに対して，適切な振幅分布を持つ超音波を付与することによって，細胞をパターニングする技術を確立した．

研究成果の学術的意義や社会的意義
　再生医療をはじめとして，培養細胞を用いた治療法が国内外で注目を集めている．我が国では世界に先駆けてiPS細胞を用いた臨床試験が実施されるなど，新たな医療産業としての期待も高い．本研究はこれらの治療において重要な役割を果たす細胞培養の自動化に関するものである．細胞の培養，剥離，回収といった一連の操作を全て超音波アクチュエーション技術で達成したことにより，従来，その多くを手作業に頼っていた細胞培養過程の自動化の基盤技術が確立され，医療・研究機関の規模の大小に関わらず細胞培養が容易となったことで臨床試験後の再生医療の普及に貢献する意義は大きい．

研究成果の概要（英文）：Cell culture technology is an important technology in cell therapy such as regenerative medicine. In this study, we aimed to establish the basic technology of automated cell culture system using ultrasonic technology.
First, it was clarified that cells attached to the bottom of culture dish can be detached without using any proteinase by applying ultrasonic vibration to culture dish. Next, ultrasonic pumping was applied to establish a method to recover the cell suspension in the culture dish by placing a glass tube close to the vibrating culture surface. Furthermore, by applying ultrasonic waves with appropriate amplitude distribution to culture dishes, we established a technology to pattern cells on a culture substrate.

研究分野：機械工学

キーワード：細胞培養　自動培養　超音波

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９、ＣＫ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

再生医療をはじめとして,培養細胞を用いた治療法が国内外で注目を集めている.たとえば,自らの関節軟骨細胞を採取・培養し，再び関節に埋め込むことによって関節機能を回復する治療法などが実施されており，将来は関節軟骨に限らず多くの組織における同様な治療の実施が期待されている．また，世界に先駆けて我が国においてiPS細胞を用いた臨床実験が実施段階となり，新たな医療の扉が開かれつつある．これらの治療において重要な役割を果たす技術のひとつが細胞培養技術であろう．一般的に，細胞の播種，培養，回収といった一連の操作がマニュアル作業によって行われ，多くの人手と時間を要している．また，一部ではロボット技術を用いて一連の操作を再現した細胞培養装置も開発されているが，比較的大型であったり，操作の一部を自動化するに留まり，患者ごとの個別対応が求められる再生医療などの普及には課題が残る．このため，医療・研究機関の規模に関わらず，簡便で効率的に細胞を培養できる新たな細胞培養システムの実現が求められている．

２．研究の目的

以上のような細胞を用いた治療法に関する背景に鑑み，超音波アクチュエーション技術を利用して，播種した細胞の培養，剥離，回収を単一の培養器で自動化し，継続して大量の細胞を培養できる全く新しい細胞培養システムを具現化することを本研究の目的とした．

３．研究の方法

(1) 培養基材からの細胞の剥離

一般的な培養基材からの細胞の剥離では，基材に接着した細胞をタンパク質分解酵素であるトリプシンに含浸し，技術者がピペッティングや振とうによって機械刺激を付与する．これに対して，本研究では培養基材の固有振動モードを励振可能な培養器を開発し，タンパク質分解作用が弱いコラゲナーゼと基材の振動を組み合わせることによって細胞培養過程における剥離作業を自動化した（図 1）．つぎに，この自動剥離方法をさらに発展させ，基材に接着した細胞への温度刺激と基材の振動を組み合わせることによって，酵素フリーでの細胞剥離を実現した（図 2）．さらに，細胞剥離の際に用いる培養基材の固有振動モードの形状と振幅を適切に制御し，一部の細胞のみを選択的に剥離して，基材上に残存した細胞が連続的に増殖する新たな連続培養法を開発した（図 3）．

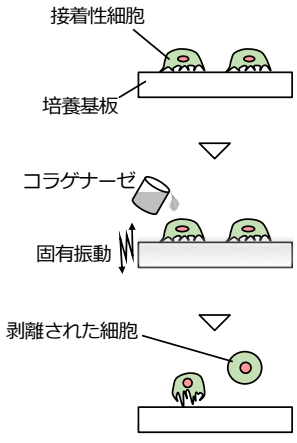


図1 コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離

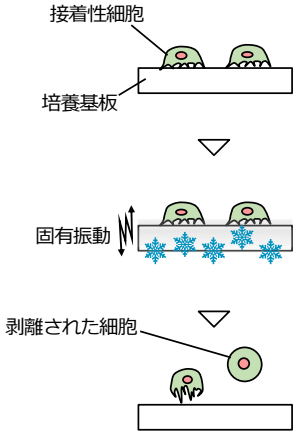


図2 温度刺激と固有振動による細胞の剥離

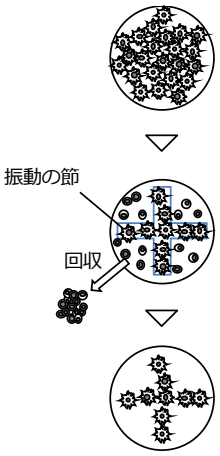


図3 固有振動による細胞の連続培養

(2) 細胞懸濁液の回収

培養基材から剥離された細胞は，一般的には技術者のピペッティングによって細胞懸濁液として回収される．本研究では，超音波ポンピングの原理に着目し，培養基材の固有振動を用いて細胞懸濁液の回収を自動化する手法を開発した．すなわち，固有振動モードで共振した培養基材に対して上方からパイプを近接させることによって細胞懸濁液を揚水し，回収する手法を具現化した．

(3) 細胞のパターニング

細胞療法などの普及には，大量培養のための増殖培養とともに，細胞パターニングなどの組織培養も重要な課題である．本研究では，培養基材に固有振動モードを励振すると基材に振動の腹と節が発生することに着目し，複数の固有振動モードを選択的に励振することによって，振動の節に細胞をパターニングする手法を開発した．

４．研究成果

(1) 培養基材からの細胞の剥離

はじめに，培養基材に接着した仔ウシ由来軟骨細胞にコラゲナーゼを添加しつつ，培養基材に固有振動モードを励振すると，ピペッティング等のマニュアル操作を必要とせずに細胞を基材から剥離できることを明らかにした．また，剥離後回収した細胞を再度 72 時間培養すると，一般的な方法で回収した細胞と比較して，有意に増殖率が高いことを明らかにした（図 4）．

つぎに，培養基材の温度を 10℃に低下させつつ，培養基材の固有振動モードを励振すると，タンパク質分解酵素を用いることなく細胞を基材から剥離できることを明らかにした．なお，剥離率は一般的な剥離方法と比較して 8 割程度であったが，剥離した細胞には細胞表面タンパク質が維持されており，細胞の健全性が保たれていることを明らかにした（図 5）．

さらに，培養基材に励振する固有振動モードの振幅を適切に制御することによって，一部の細胞を基材上に残存させ，連続的に培養した結果，細胞を新たに播種する場合と比較して，72 時間後の細胞数が約 1.5 倍に向上することを明らかにした（図 6）．

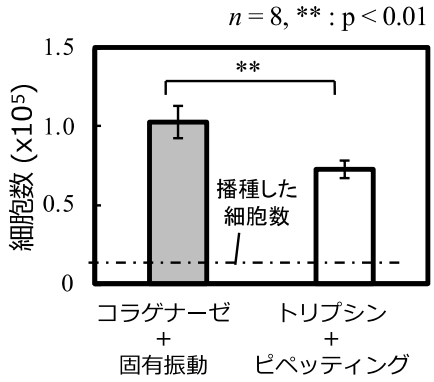
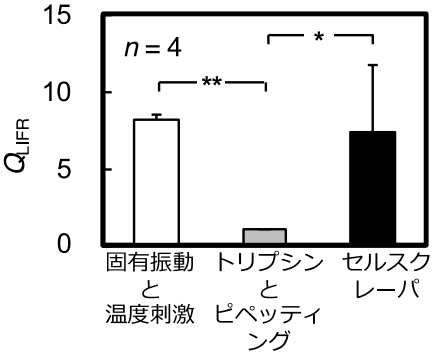


図4 剥離方法の違いによる72hr後の細胞数



細胞表面のタンパク質（LIFR）

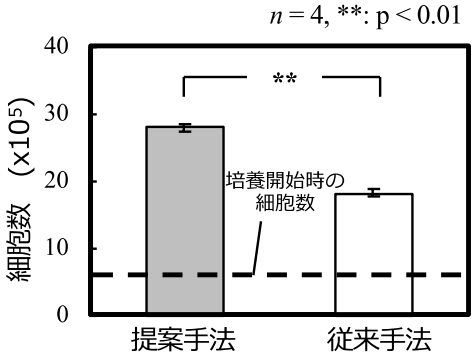
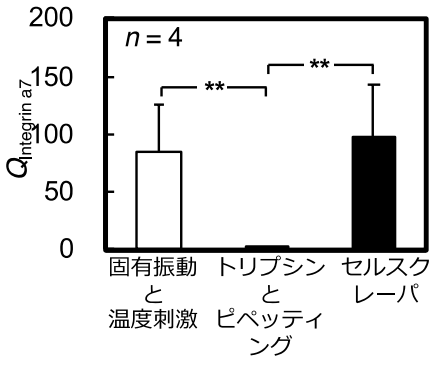


図 6 連続培養による72hr後の細胞数



細胞表面のタンパク (Integrin α7)

図5 剥離方法の違いによる表面タンパクの違い

(2) 細胞懸濁液の回収

細胞懸濁液を含有した培養器の底面に固有振動モードを励振しつつ，上方からガラス管を近接させると，細胞懸濁液を回収できることを明らかにした．なお，ガラス管を培養基材近傍まで近づけることから，細胞懸濁液中からは細胞塊が排除され，単細胞の細胞懸濁液を回収できる副次的な効果も明らかとなった（図 7）．

(3) 細胞のパターニング

細胞培養基材の固有振動モード，あるいは，上方に細胞培養ディッシュを配置した円板状振動子の固有振動モードを利用することによって，培養器内の細胞を固有振動モードの節の形状にパターニングできることを明らかにした．図 8 は円状の節を有する固有振動モードを振動子に励振し，細胞培養ディッシュ内の細胞を円状に

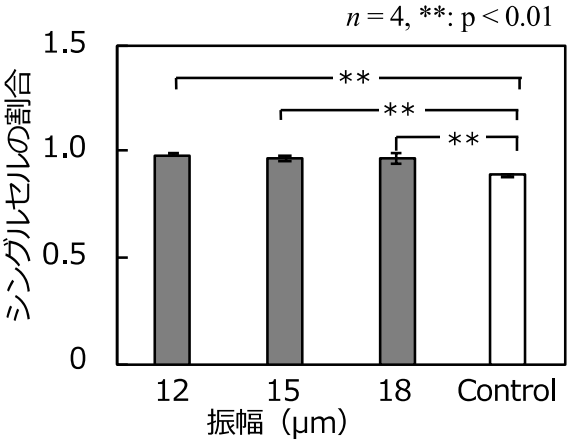


図7 回収した懸濁液中のシングルセルの割合

パターニングした結果である．なお，図 8 はパターニングされた細胞を継続して 120 時間培養した際の様子であり，パターニング後も細胞は健全性を保っていることを明らかにした．

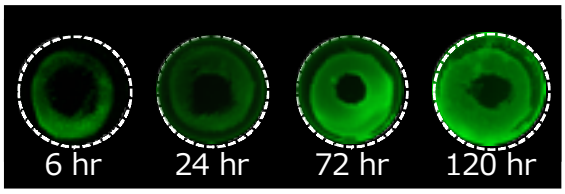


図8 培養ディッシュ上にパターニングした細胞

以上のように, 本研究は, マニュアル操作に頼らない細胞培養システムを具現化するために, 超音波アクチュエーション技術を援用して細胞の剥離，回収およびパターニング行ための新たな知見を得たものであり，現在，こうした技術を統合した細胞培養システムの実現に取り組んでいる．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 7 件）

① Misa Nakao, Chikahiro Imashiro, Taiki Kuribara, Yuta Kurashina, Kiichiro Totani, Kenjiro Takemura, Formation of large scaffold-free three-dimensional aggregates in a cell culture dish by ultrasound standing wave trapping, Ultrasound in Medicine and Biology, 査読あり, 45, 2, pp. 1306-1315.
② Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Taiki Kuribara, Makoto Hirano, Kiichiro Totani, Kenjiro Takemura, Cell patterning method on a clinically ubiquitous culture dish using acoustic pressure generated from resonance vibration of a disk-shaped ultrasonic transducer, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 査読あり, 66, 1, pp. 11-118, 2019.
③ Misa Nakao, Yuta Kurashina, Chikahiro Imashiro, Kenjiro Takemura, A method for collecting single cell suspensions using an ultrasonic pump, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 査読あり, 65, 1, pp. 224-231, 2018.
④ Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, James Friend, Cell agglomeration in the wells of a 24-well plate using acoustic streaming, Lab on a Chip, 査読あり, 17, pp. 876-886, 2017.
⑤ Yuta Kurashina, Makoto Hirano, Chikahiro Imashiro, Kiichiro Totani, Jun Komotori, Kenjiro Takemura, Enzyme-free cell detachment mediated by resonance vibration with temperature modulation, Biotechnology & Bioengineering, 査読あり, 114, 10, pp. 2279-2288, 2017. [Front Cover of the issue]
⑥ Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, James Friend, Shogo Miyata, Jun Komotori, Efficient subculture process for adherent cells by selective collection using cultivation substrate vibration, IEEE Transactions on Biomedical Engineering, 査読あり, 64, 3, pp. 580-587, 2017.
⑦ Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Cell Patterning Method Using Resonance Vibration of a Metallic Cell Cultivation Substrate, Advanced Biomedical Engineering, 査読あり, 5, pp. 142-148, 2016.

〔学会発表〕（計 21 件）

① Chikahiro Imashiro, Makoto Hirano, Yuki Fukuma, Kiyoshi Ohnuma, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Cell sheet fabrication by Langevin piezoelectric transducer having homogeneous thickness vibration mode, EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, 2018
② Yuki Fukuma, Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, James Friend, Kenjiro Takemura, Establishment of cell culture method using ultrasonic atomization, EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, 2018.
③ Jiyang Mei, Takumi Inui, Yuta Kurashina, James Friend, Kenjiro Takemura, Cell Detachment using guided surface acoustic waves, 2018 IEEE International Ultrasonic Symposium, 2018.
④ 福間優希，寺尾優佑，倉科佑太，竹村研治郎，音響放射圧とエクマン輸送を用いた細胞凝集塊の生成，日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2018，2018
⑤ Yuki Fukuma, Takumi Inui, Chikahiro Imashiro, Kenjiro Takemura, Homogenizing Cell Seeding Density on Cell Culture Surface by using Ekman Transport, The 40th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2018.
⑥ Genichiro Fujii, Yuta Kurashina, Osamu Takahara, Kazuhide Kodeki, Akira Morikawa, Tetsushi Azuma, Kenjiro Takemura, Cell Suspension Culture using Acoustic Flow, The 40th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2018.
⑦ Takumi Inui, Yuta Kurashina, Chikahiro Imashiro, Kenjiro Takemura, Selective Cell Elimination

Mediated by Ultrasonic Irradiation, The 40th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, 2018.

⑧ 榎本海，藤井弦一郎，今城哉裕，竹村研治郎，側方からの超音波照射による細胞遊走の制御，第 17 回日本再生医療学会，2018.

⑨ 中尾美紗，今城哉裕，栗原大輝，倉科佑太，戸谷希一郎，竹村研治郎，細胞培養ディッシュ内の定在波を用いたスキャフォールドフリー三次元細胞組織の生成，第 17 回日本再生医療学会，2018.

⑩ 倉科佑太，竹村研治郎，超音波振動と温度刺激を用いた接着性細胞の剥離，電気学会バイオ・マイクロシステム研究会，2018.

⑪ Misa Nakao, Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Acoustic Cell Trapping to Rapidly Generate Three-dimensional Large Tissues, TERMIS-AM2017, 2017.

⑫ Hanako Tauchi, Genichiro Fujii, Chikahiro Imashiro, Kenjiro Takemura, Detaching cells from cultivation flask using acoustic radiation pressure induced by Langevin transducer, Acoustofluidics 2017, 2017.

⑬ 倉科佑太，今城哉裕，坪井仁美，平塚傑工，竹村研治郎，DLC 成膜ディッシュ上に接着した CHO 細胞の音響放射圧による剥離, 日本機械学会 Dynamics and Design Symposium 2017, 2017.

⑭ 中尾美紗，倉科佑太，今城哉裕，竹村研治郎，音響放射圧を用いた細胞回収ポンプによる単一細胞の選択的回収，第 16 回日本再生医療学会，2017.

⑮ 乾拓未，今城哉裕，中尾美紗，倉科佑太，竹村研治郎，ホーン付きランジュバン型振動子を用いた接着性細胞の選択的除去，第 16 回日本再生医療学会，2017.

⑯ Yusuke Terao, Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, A Method to Generate 3D Cell Tissue using Acoustic Streaming, EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, 2016.

⑰ Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Misa Nakao, Kenjiro Takemura, Viability of Myoblasts Manipulated by Resonance Vibration of a Disk-shaped Transducer with a Single Nodal Circle, EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, 2016.

⑱ Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Manipulation of Myoblasts in Cell Cultivation Dish Using Resonance Vibration of Disk with a Single Nodal Circle, 2016 IEEE International Ultrasonic Symposium, 2016.

⑲ Yuta Kurashina, Chikahiro Imashiro, Kenjiro Takemura, Jun Komotori, Selectively Detaching Highly Proliferative Cells using Temperature Modulation and Resonance Vibration of Cultivation Substrate, 2016 IEEE International Ultrasonic Symposium, 2016.

⑳ Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Cell patterning method using resonance vibration of metallic cell cultivation substrate, 生体医工学シンポジウム, 2016.

21 中尾美紗，倉科佑太，今城哉裕，竹村研治郎，音響放射圧を用いたポンピングシステムによるウサギ由来角膜細胞の回収，日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2016, 2016.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計 8 件）

名称：細胞パターニング装置及び細胞パターニング方法
発明者：今城哉裕，倉科佑太，竹村研治郎，寺尾優佑
権利者：同上
種類：特許
番号：特開 2018-042534
出願年：2016
国内外の別： 国内

名称：細胞処理装置及び細胞処理方法
発明者：寺尾優佑，倉科佑太，竹村研治郎，福田恵一，藤田淳，遠山周吾
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2016-252754
出願年：2016
国内外の別： 国内

名称：細胞生産方法及び細胞生産装置
発明者：倉科佑太，今城哉裕，竹村研治郎，平塚傑工，中森秀樹
権利者：同上
種類：特許

番号：特願 2017-153717
出願年：2017
国内外の別：国内

名称：細胞生産方法及び細胞生産装置
発明者：今城哉裕，倉科佑太，竹村研治郎
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2017-163728
出願年：2017
国内外の別：国内

名称：攪拌装置、細胞培養装置及び攪拌方法
発明者：高原修，小出来一秀，守川彰，東哲史，竹村研治郎，寺尾優佑，藤井弦一郎，倉科佑太
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-072314
出願年：2018
国内外の別： 国内

名称：細胞培養装置、細胞培養方法及びプログラム
発明者：高原修，小出来一秀，守川彰，東哲史，竹村研治郎，倉科佑太，藤井弦一郎
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2018/025577
出願年：2018
国内外の別： PCT

名称：細胞生産方法及び細胞生産装置
発明者：今城哉裕，倉科佑太，竹村研治郎
権利者：同上
種類：特許
番号：PCT/JP2018/031692
出願年：2018
国内外の別： PCT

名称：細胞処理装置及び細胞処理方法
発明者：福間優希，今城哉裕，竹村研治郎，倉科佑太
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2018-230363
出願年：2018
国内外の別： 国内

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.takemura.mech.keio.ac.jp/

６．研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
研究協力者氏名：ジェームズ　フレンド
ローマ字氏名：James Friend

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。