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

Title	弾性表面波からの放射圧を用いた細胞接着の力学的特性の解明
Sub Title	Quantification of mechanical properties of cell adhesion using acoustic radiation pressure generated by surface acoustic waves
Author	竹村, 研治郎(Takemura, Kenjiro)
Publisher	
Publication year	2022
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2021.)
JaLC DOI	
Abstract	細胞培養の自動化は再生医療や創薬において重要な課題である．細胞接着性は細胞の重要な機械的特性のひとつであり，細胞培養の自動化を達成する場合にも定量的な把握が重要である．本研究では，表面弾性波デバイス上に培養した細胞に対して表面弾性波を照射した際に見られる剥離現象を利用して，細胞接着性の違いを定量的に測定する方法を開発した．表面弾性波デバイス上に培養した筋芽細胞に対して剥離前の前処理としてのPBS浸漬時間を変えることによって接着力を変化させ，本手法によって剥離力を定量的に比較できることを明らかにした． Automation of cell culture is an important issue in regenerative medicine and drug discovery. Cell adhesion is one of the important mechanical properties of cells, and it is important to quantitatively understand cell adhesion in order to achieve automation of cell culture. In this study, we developed a method to quantitatively measure differences in cell adhesion using the detachment phenomenon observed when cells cultured on a surface acoustic wave device are irradiated with surface acoustic waves. The adhesive strength of myoblasts cultured on the surface acoustic wave device was varied by changing the immersion time in PBS as a pretreatment before detachment, and it was clarified that the detachment strength could be quantitatively compared by the proposed method.
Notes	研究種目：国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化) 研究期間：2018～2021 課題番号：17KK0119 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_17KK0119seika

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　Ｆ－１９－２

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　５ 月 ２３ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）
研究期間：2018～2021
課題番号：１７ＫＫ０１１９

研究課題名（和文）弾性表面波からの放射圧を用いた細胞接着の力学的特性の解明

研究課題名（英文）Quantification of mechanical properties of cell adhesion using acoustic radiation pressure generated by surface acoustic waves

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）　11,600,000円
渡航期間：　９ヶ月

研究成果の概要（和文）：細胞培養の自動化は再生医療や創薬において重要な課題である．細胞接着性は細胞の重要な機械的特性のひとつであり，細胞培養の自動化を達成する場合にも定量的な把握が重要である．本研究では，表面弾性波デバイス上に培養した細胞に対して表面弾性波を照射した際に見られる剥離現象を利用して，細胞接着性の違いを定量的に測定する方法を開発した．表面弾性波デバイス上に培養した筋芽細胞に対して剥離前の前処理としてのPBS浸漬時間を変えることによって接着力を変化させ，本手法によって剥離力を定量的に比較できることを明らかにした．

研究成果の学術的意義や社会的意義
再生医療などが新たな医療産業として注目される中，細胞の大量培養技術への期待が高まっており，細胞の培養，剥離，回収，パターニングといった作業を自動化する意義は大きい．これに対して，培養基材に適切な固有振動モードを励振することで，細胞を剥離する手法や，回収・再播種を伴わない連続的な増殖培養を可能にする手法などの有効性が示されているものの，細胞剥離メカニズムが不明確で剥離条件の最適化などが困難であった．本研究により超音波照射によって細胞接着の力学的特性を明らかにする手法が確立されたため，超音波技術を利用した細胞の自動大量培養技術の普及に向けた理論基盤の構築に貢献でき，学術的・社会的意義は大きい．

研究成果の概要（英文）：Automation of cell culture is an important issue in regenerative medicine and drug discovery. Cell adhesion is one of the important mechanical properties of cells, and it is important to quantitatively understand cell adhesion in order to achieve automation of cell culture. In this study, we developed a method to quantitatively measure differences in cell adhesion using the detachment phenomenon observed when cells cultured on a surface acoustic wave device are irradiated with surface acoustic waves. The adhesive strength of myoblasts cultured on the surface acoustic wave device was varied by changing the immersion time in PBS as a pretreatment before detachment, and it was clarified that the detachment strength could be quantitatively compared by the proposed method.

研究分野：機械工学

キーワード：細胞接着特性　音響放射圧　表面弾性波デバイス

※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、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

iPS 細胞の樹立などによって，国内外で再生医療をはじめとした細胞療法や培養細胞による薬効評価などが注目されている．これに伴って，細胞を大量に培養できる簡便な細胞培養技術の実現が期待されている．このため，国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）申請の際に実施中であった基課題（基盤研究 B : 16H04259）において，培養基材に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，培養した細胞の基材からの剥離，細胞懸濁液の回収，基材上での細胞のパターニングといった *in vitro* での細胞培養操作を選択的に切り替えられる細胞培養システムを研究していた．この細胞培養システムは単一の培養器に対する入力信号の変更だけで上記の機能を切り替えられるため，培養，剥離，回収，パターニングを連続的に繰り返すことができる小型で簡便な細胞培養システムとして細胞療法の発展・普及への貢献が期待できる．これに対して，研究開始当初までに以下の研究成果を得ていた．

(1) 培養基材への超音波照射によって，タンパク質分解酵素なしで，あるいは希釈されたタンパク質分解酵素を用いて培養基材から細胞を剥離可能，
(2) 超音波ポンピングの原理を応用して，培養チャンバ内の細胞懸濁液を回収可能，
(3) 培養基材の異なる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可能．

すなわち，超音波振動する弾性体から発せられる音響放射圧を適切に利用することによって，技術者の手技に頼っていた細胞培養操作を自動化し，高度化できる可能性が示されていた．

２．研究の目的

上記の研究開始当初の背景および代表者の研究成果に対して，細胞に対して音響放射圧がどのように作用し，例えば基材からの細胞剥離が達成されるのかといったメカニズムや理論は明らかになっていなかった．基課題の研究成果を細胞工学における基盤技術とするには，こうした理論的背景の充実が極めて重要な課題である．すなわち，接着性細胞に対して音響放射圧が作用した際に細胞・基材間接着や細胞・細胞間接着が剥離される条件を明らかにする必要がある．このため，本国際共同研究では，表面弾性波（Surface Acoustic Wave, SAW）による音響放射圧を用いて細胞接着の力学特性を明らかにし，代表者が提案する超音波を利用した細胞培養技術に対する理論的裏付けを獲得するための測定方法の確立を目的とした．

３．研究の方法

はじめに，SAW を用いた細胞剥離装置を製作した．装置の概要を図 1 に示す．本装置は SAW デバイス固定治具，振動吸収材，LiNbO3 基板で形成した SAW デバイス，培養チャンバ壁，カバーガラスから構成されている．SAW デバイスと壁で培養チャンバを構成し，SAW デバイスの表面で細胞培養が可能である．なお，SAW デバイス上で培養された細胞の健全性に問題ないことは予備実験で確認した．

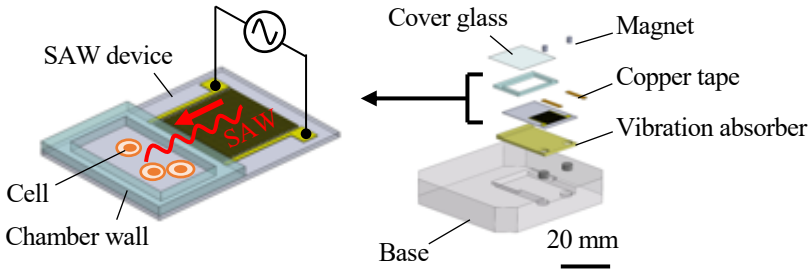

図 1　SAW を用いた砂防剥離装置の概要

SAW デバイスに 9.62 MHz の交流電圧を印加すると培養面に SAW が伝播し，図 2a のように培養液中に伝播した縦波の減衰によって音響流が発生する．これにより，SAW 表面に接着培養された細胞には流体刺激が加わることとなり，細胞が剥離される．なお，SAW により音響流を発生させることにより，外部からのポンピングによる流体刺激と比較して，応答よく流体刺激を細胞に印加できる利点がある．

SAW デバイスへの電圧印加によって細胞培養チャンバ内には音響流が発生する．このとき，細胞には図 2b のような力が加わると仮定した．流体力学的な抗力 F_d およびトルク M は，滑らかな基材と接触する粒子に関する過去の研究（I. Goldasteh et al., *J. Aerosol Science*, Vol. 66 (2013), pp. 62-71）から，

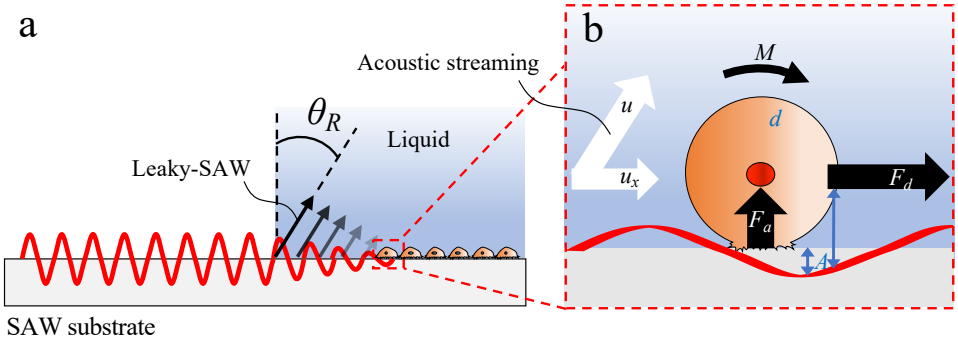

図 2 SAW による音響流の発生と細胞に作用する力

$$F_d = \frac{3\pi\Gamma\rho_p f d^2 u_x^2}{2C_c}(1 + 0.15Re^{0.678}) \quad (1)$$

$$M = \frac{2\pi\mu f d^2 u_x}{C_c} \quad (2)$$

と書ける．ただし，Γ：流速分布に関する係数（=1），ρ_p：媒質（本研究では PBS）の密度（=1.007×103 kg/m3），f：壁面効果に関する補正係数（=0.944），d：細胞直径（≃10 μm），Cc：非連続体を考慮した補正係数（≃1），Re：レイノルズ数，μ：媒質（本研究では PBS）の粘性係数（=8.94×10-4 Pa·s）である．なお，細胞には音響放射力も加わると考えられるが，オーダー評価の結果，流体力学的な力に比べて十分に小さい．細胞が流体力によって転がると考えれば，細胞が剥離される際に受ける力 F_{cell} は，

$$F_{cell} = \frac{F_h \cdot \frac{d}{2} + M_h}{a} \quad (3)$$

と概算できる．

４．研究成果

細胞培養チャンバにマウス由来筋芽細胞株 C2C12 を 1.0×10^2 個/mm^2 の密度で播種し，24 h 培養した．その後，培地に代えて PBS を導入し，PBS 浸漬時間 0, 10, 60 min の 3 水準として細胞サンプルを準備した．剥離のための SAW デバイスの駆動条件は，周波数：9.62 MHz，電圧：0～174 V である．実験結果を図 3a に示す．同図より，電圧の増加に伴って剥離率 Rd が増加していることがわかる．また，同様の電圧においては，PBS 浸漬時間が長いほど剥離率が高い．特に，PBS 浸漬時間 60 min では他の条件に比べて剥離率が高く，PBS への浸漬によって，細胞の接着性が低下していることが明らかとなった．

上記と同様に C2C12 のサンプルを準備し，培養時間を 8h，24h の 2 水準とし，PBS 浸漬時間は 0 min で固定した．その他の実験条件は上記と同様とした際の実験結果を図 3b に示す．培養時間が短いと同様の SAW デバイス駆動条件においても剥離率が大きく向上していることが明らかとなり，細胞サンプルを準備する際の培養時間が細胞の基材への接着性に大きく影響していることが明らかとなった．

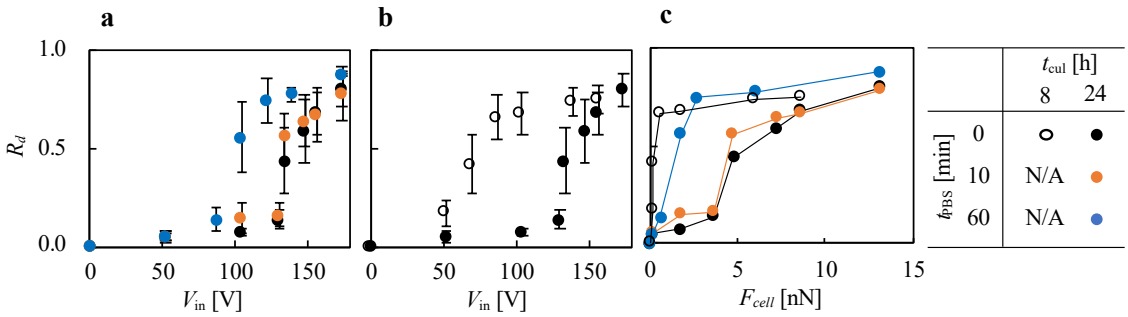

図 3　培養条件の違いによる剥離率の測定結果

開発した装置で細胞を剥離した際に細胞に加わる力 F_{cell} は式（3）によって概算できる．計算に必要な流速 u_x を粒子画像流速測定法（Particle Image Velocimetry, PIV）で定量し，F_{cell} と細胞剥離率 R_d の関係を求めた結果を図 3c に示す．同図から，C2C12 が培養時間および PBS 浸漬時間の変化よって，剥離に必要な力が変化する様子を定量的に把握できることがわかる．例えば，PBS 浸漬時間が 0 min で同様で培養時間が異なる図中●（24 h）と○（8 h）を剥離率 0.5 付近で比較すると，剥離に必要な力は 10 倍程度変化することが明らかとなった．

以上の様に，本研究によって，SAW を用いて細胞接着の力学特性を定量的に明らかにできる測定方法を確立した．

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計5件（うち査読付論文　4件／うち国際共著　4件／うちオープンアクセス　5件）

１．著者名 Inui Takumi、Mei Jiyang、Imashiro Chikahiro、Kurashina Yuta、Friend James、Takemura Kenjiro	４．巻 21
２．論文標題 Focused surface acoustic wave locally removes cells from culture surface	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Lab on a Chip	６．最初と最後の頁 1299～1306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D0LC01293A	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Inui Takumi、Mei Jiyang、Imashiro Chikahiro、Kurashina Yuta、Friend James、Takemura Kenjiro	４．巻 21
２．論文標題 Front cover	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Lab on a Chip	６．最初と最後の頁 1189～1189
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/D1LC90037D	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Kurashina Yuta、Imashiro Chikahiro、Hirano Makoto、Kuribara Taiki、Totani Kiichiro、Ohnuma Kiyoshi、Friend James、Takemura Kenjiro	４．巻 2
２．論文標題 Enzyme-free release of adhered cells from standard culture dishes using intermittent ultrasonic traveling waves	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Communications Biology	６．最初と最後の頁 393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0638-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

１．著者名 Inui Takumi、Kurashina Yuta、Imashiro Chikahiro、Takemura Kenjiro	４．巻 19
２．論文標題 Method of localized removal of cells using a bolt‐clamped Langevin transducer with an ultrasonic horn	５．発行年 2019年
３．雑誌名 Engineering in Life Sciences	６．最初と最後の頁 575～583
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/elsc.201800173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Jiyang Mei、Aditya Vasan、Uri Magaram、Kenjiro Takemura、Sreekanth H. Chalasani、James Friend	4．巻 -
2．論文標題 Well-free agglomeration and on-demand three-dimensional cell cluster formation using guided surface acoustic waves through a couplant layer	5．発行年 2022年
3．雑誌名 Biomedical Microdevices	6．最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　0件／うち国際学会　3件）

1．発表者名 Jiyang Mei、Kenjiro Takemura、 James Friend
2．発表標題 Cell agglomeration using guided surface acoustic waves through a couplant layer.
3．学会等名 178th Meeting of the Acoustical Society of America
4．発表年 2019年

1．発表者名 Yuta Kurashina、Chikahiro Imashiro、Kenjiro Takemura
2．発表標題 Detachment of Multiple Adherent Cell Types by Ultrasonic Irradiation to Consumable Cell Culture Dishes
3．学会等名 The 2019 IEEE International Ultrasonics Symposium（国際学会）
4．発表年 2019年

1．発表者名 Takumi Inui、Yuta Kurashina、Chikahiro Imashiro、Kenjiro Takemura
2．発表標題 Selective Cell Elimination Mediated by Ultrasonic Irradiation
3．学会等名 The 40th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society（国際学会）
4．発表年 2018年

１．発表者名 Jiyang Mei、Takumi Inui、Yuta Kurashina、James Friend、Kenjiro Takemura
２．発表標題 Cell Detachment using guided surface acoustic waves
３．学会等名 2018 IEEE International Ultrasonic Symposium（国際学会）
４．発表年 2018年

１．発表者名 栗山拓真、Jiyang Mei、James Friend、竹村研治郎
２．発表標題 表面弾性波を利用した細胞剥離による細胞接着性の定量的比較
３．学会等名 日本機械学会Dynamics and Design Conference 2021
４．発表年 2021年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

慶應義塾大学マイクロ／ナノメカトロニクス研究室 http://www.takemura.mech.keio.ac.jp/

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
アメリカ合衆国	カリフォルニア大学サンディエゴ校	ソーク研究所		