

学位論文 博士（工学）

超音波を用いた汎用培養容器における
細胞マニピュレーション
－ 細胞のパターニングおよび細胞シートの剥離 －

2019年5月

慶應義塾大学大学院理工学研究科

今 城 哉 裕

— 目次 —

第1章 序論	1
1.1 細胞を用いた医療	1
1.1.1 バイオテクノロジー応用医薬品	1
1.1.2 薬剤スクリーニング	3
1.1.3 再生医療	3
1.2 細胞培養プロセスにおける課題	5
1.2.1 細胞培養法の課題	6
1.2.2 細胞回収方法の課題	10
1.3 細胞パターニングの先行研究	12
1.3.1 バイオプリンタによる細胞パターニング	13
1.3.2 磁気標識によるパターニング	14
1.3.3 培養面の表面改質によるパターニング	15
1.3.4 定在波によるパターニング	16
1.3.5 各パターニング手法の比較	17
1.4 細胞シート剥離の先行研究	17
1.4.1 温度応答性ポリマを用いた細胞シートの剥離	18
1.4.2 金-チオール反応を用いた細胞シートの剥離	20
1.4.3 高分子電解質を用いた細胞シートの剥離	21
1.4.4 光応答性基材を用いた細胞シートの剥離	23
1.4.5 磁気ビーズを用いた細胞シートの剥離	23
1.4.6 培地成分の調整による細胞シートの剥離	23
1.5 細胞培養分野において超音波振動を用いた先行研究	25
1.5.1 生体への医療応用	26
1.5.2 細胞の増殖性の向上	26
1.5.3 細胞分化の制御	27
1.5.4 細胞遊走の促進	28
1.5.5 遺伝子導入への応用	30
1.6 研究目的	32
第2章 培養基材に励振した固有振動モードを用いた細胞パターニング	35
2.1 コンセプト	35
2.2 培養基材の製作	38
2.2.1 培養面の設計	38
2.2.2 圧電素子の設計	41
2.2.3 培養面および圧電素子の製作とこれらの接着	44
2.3 細胞パターニングデバイスの製作	48

2.3.1	細胞パターンニングデバイスの設計	48
2.3.2	部品の製作と組み立て	49
2.4	細胞パターンニングデバイスの振動特性の評価	49
2.4.1	固有振動数の測定	52
2.4.2	入力電圧と最大振幅の関係の測定	52
2.4.3	振幅分布の測定	52
2.5	培養基材に励振した固有振動モードを用いた細胞パターンニング実験の方法	55
2.5.1	細胞パターンニングデバイスの滅菌	55
2.5.2	細胞の準備	57
2.5.3	細胞パターンニング実験の方法	57
2.6	培養基材に励振した固有振動モードを用いた細胞パターンニング実験の結果および考察	59
2.6.1	細胞数とパターンニングの関係	59
2.6.2	振動振幅とパターンニングの関係	62
2.7	小括	67
第3章	汎用培養ディッシュ内における超音波を用いた細胞パターンニング	68
3.1	コンセプト	68
3.2	振動子の設計と製作	71
3.3	細胞パターンニングデバイスの設計と製作	74
3.3.1	カップリングリキッドの選定	74
3.3.2	デバイス全体の設計および製作	76
3.4	細胞パターンニングデバイスの振動特性の評価	80
3.4.1	固有振動数の測定	81
3.4.2	入力電圧と最大振幅の関係の測定	82
3.4.3	振幅分布の測定	84
3.4.4	培地温度の測定	85
3.5	汎用培養ディッシュ内における超音波を用いた細胞パターンニング実験の方法	86
3.5.1	細胞の準備	87
3.5.2	細胞パターンニングの際の実験手順	88
3.5.3	細胞パターンニングの評価	88
3.5.4	増殖性の評価	88
3.5.5	細胞の3次元構造の確認	89
3.5.6	タンパク質の定量	90
3.6	汎用培養ディッシュ内における超音波を用いた細胞パターンニング実験の結果および考察	91
3.6.1	振動振幅とパターンニングの関係	91
3.6.2	増殖性	92
3.6.3	3次元方向への積層	96
3.6.4	タンパク質の定量	98

3.6.5 本手法の汎用性	99
3.7 小括	100
第4章 超音波による汎用培養容器からの細胞シートの剥離	103
4.1 コンセプト	103
4.2 細胞シート剥離デバイスの設計および製作	105
4.3 細胞シート剥離デバイスの評価	107
4.3.1 固有振動数の測定	107
4.3.2 振幅分布の測定	110
4.3.3 入力電圧と培地温度の関係の測定	111
4.4 細胞シート剥離実験の方法	113
4.4.1 細胞の準備	114
4.4.2 細胞シート剥離実験の手順	114
4.5 細胞シート剥離実験の結果および考察	114
4.5.1 印加電圧と細胞シート剥離の関係	114
4.5.2 細胞シートの剥離に要する時間	116
4.6 剥離した細胞シートの評価方法	118
4.6.1 細胞シート染色	118
4.6.2 ウェスタンブロッティング (WB)	120
4.6.3 代謝の定量	121
4.7 剥離した細胞シートの評価結果および考察	123
4.7.1 剥離した細胞シートの機能性	123
4.7.2 剥離した細胞シートのタンパク質発現	125
4.7.3 剥離した細胞シートの代謝	127
4.8 提案手法の汎用性について	131
4.8.1 細胞培養容器の汎用性について	131
4.8.2 細胞種の汎用性について	136
4.8 小括	137
第5章 結論	138
謝辞	142
参考文献	143
本研究に関する業績	153

序論

1.1 細胞を用いた医療

近年、医療技術の発展は目覚ましい。なかでも、培養細胞を利用した医療は注目を集めており、従来の医療と比較して優れた治癒成果が報告されている¹⁻³。培養細胞の医療への応用は、バイオテクノロジー応用医薬品、薬剤スクリーニングと再生医療とに大別できる⁴⁻⁶。本節では、これらの概要を説明する。

1.1.1 バイオテクノロジー応用医薬品

従来の医薬品（合成医薬品）は、タンク内の化学反応で製造されているが、バイオテクノロジー応用医薬品は、細胞が生産する特定のタンパク質から製造される。すなわち、細胞を反応槽として用いることで医薬品を製造している。生体内で生成される生理活性物質を医薬品として用いて治療を行う試みは、古くより存在しており、人や動物の体液から精製されたタンパク質を医薬品として用いていた。ブタやウシの膵臓由来インスリンがその一例であり、糖尿病の治療に用いられてきた。しかし、医薬品の製造効率の低さなどが課題であった。そこで、開発されたのがバイオテクノロジー応用医薬品である。これは、遺伝子組み換え、細胞融合や細胞培養などのバイオテクノロジー技術を利用して細胞に所望のタンパク質を生産させている。生物由来の医薬品であるバイオテクノロジー応用医薬品は従来の合成医薬品と比較して、高い治療効果を持ちながら、副作用が少ないことが報告されている。とくに、糖尿病、がん、自己免疫疾患などの分野では不可欠な存在になっている^{3,4}。

このように高い治療効果も報告されているが、課題も報告されている。第一に、コンタミネーションのリスクが指摘されている⁷。通常の細胞培養と同じで、外部からウイルスや他の細胞が混入するリスクがある。さらに、使用する細胞株を樹立した際に、動物の血清（とくにウシの血清が頻繁に用いられる）などを使っている場合は、そこからのコンタミネーションも危惧される⁸。また、細胞は死滅した際に DNA 等の細胞内部の物質を排出するため、これらが特定のタンパク質以外の物質として混入するリスクもある。第二に、医薬品の生産量が安定しないことが指摘されている³。これは細胞を反応曹として用いているため、細胞の性質が変化してしまうと、特定のタンパク質の生産効率が変わることによって起る。細胞の性質を均一に保つためには、化学的にも機械的にも均一な状態で全ての細胞を保つことが理想である。同一の培養チャンバの中で培養することによって、化学的な均一性はある程度担保できるが、細胞は周囲の細胞から機械的な刺激を受けるため、細胞の位置を制御できない現在の培養方法（1.2 節に後述）には課題がある^{9,10}。

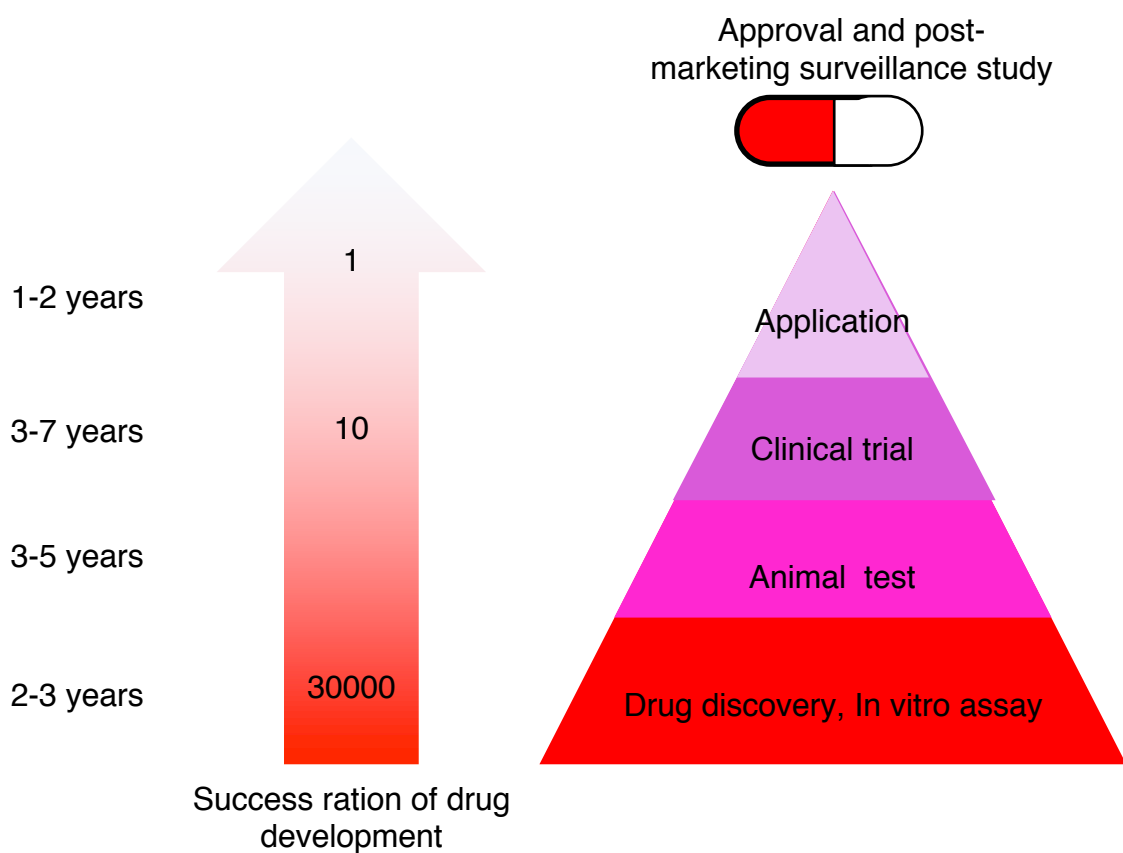


Figure 1-1. Process of drug development

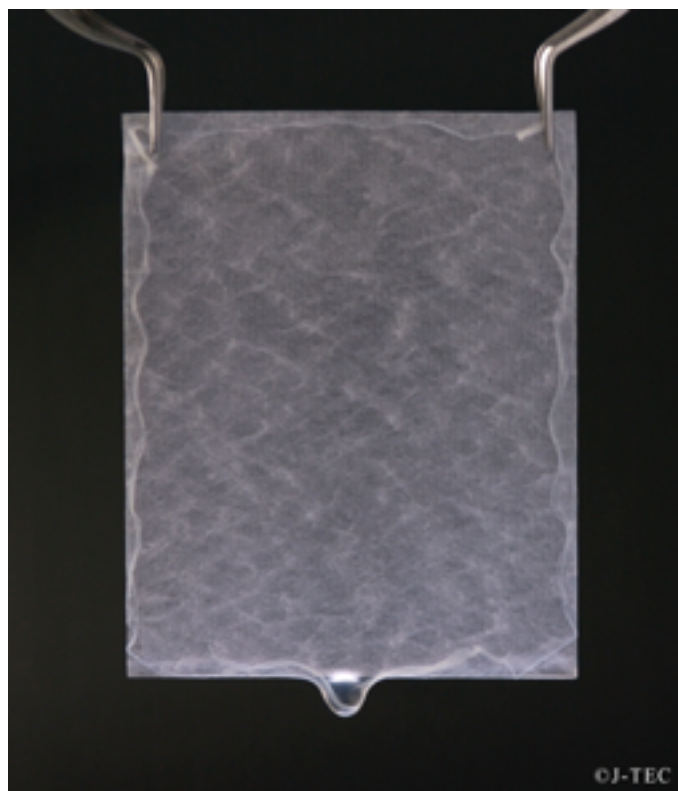
1.1.2 薬剤スクリーニング

新しい医薬品を開発する際の流れを Figure 1-1 に示す。図に示すように、医薬品を作る際は、探索研究で薬効のある化合物を探索し、ヒットしたものを非臨床試験で動物に投与し、この段階をクリアした化合物のみがヒトを用いた臨床試験に用いられる⁶。この段階を突破した化合物が、医薬品として申請され、その後も重篤な副作用などの可能性を鑑みて市販後調査が行われる。医薬品が製品として申請されるには、1つの医薬品を開発するために、おおよそ13.5年の開発期間と1800億円の開発費が必要と言われている¹¹。このため効率的な創薬手法の開発が期待されている。創薬プロセスで、とくに課題となっているのは、探索研究と非臨床試験である。探索研究では、培養細胞に対して化合物を添加し、その反応を確かめる実験がしばしば行われる¹²。しかし、生体外において培養した細胞と、生体内の細胞の反応が異なることが問題となっている¹³。さらに、非臨床試験で行う動物実験は、倫理的問題以外にも、コスト面での課題、さらに動物とヒトの種差による結果の差異が課題として報告されている¹⁴⁻¹⁷。こういった課題を解決するために、臓器オンチップ (Organ-on-a-chip) と呼ばれる臓器モデルをチップ上に具現化する研究が行われている^{13,18}。このような、生体外において培養した細胞を用いた薬剤スクリーニング手法において、生体内に近い機能を有する細胞の生成が重要である。細胞が機能を維持、獲得するためには、培養される細胞の環境を化学的にも、物理的にも生体内に近づける必要がある。化学的な環境に関しては、生体内の環境を再現すべく、細胞を培養する培地の研究開発が進められてきている^{19,20}。しかし、物理的な関係に影響を与える周囲の細胞との位置関係については、現在の培養方法では適切に制御されておらず、無作為に細胞を播種するのみである²¹。

1.1.3 再生医療

再生医療は Langer と Vacanti により 1993 年に提唱された全く新しい概念の医療である²²。生体外で培養した細胞を患者に移植する事で、臓器の機能不全なども根治できる可能性があり、従来の医療と比較して良好な治療効果があることが報告されている²³。近年の再生医療の発展は目覚ましく、一部の治療はすでに実用化もされている。国内における保険適応を受けた再生医療等製品の例として、株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリングの自家培養表皮ジェイス[®]と自家培養軟骨ジャック[®] (Figure 1-2) が挙げられる。自家培養表皮ジェイス[®]は、Green らによって報告された方法で患者自身の表皮細胞を採取し、シート状に培養した製品である^{24,25}。1981年にアメリカにて最初の臨床応用が行われ、1988年には世界初の再生医療製品としてアメリカで製品化された。その後も世界各国で製品化され、2009年に日本でも保険適応を受けている^{26,27}。一方で、自家培養軟骨ジャック[®]は患者自身の軟骨細胞を

採取し、アテロコラーゲンゲルの中に包埋して培養した製品である。これを再度、患部に移植することにより、膝関節における外傷性軟骨欠損症又は離断性骨軟骨炎の治療を行う。本製品は越智らが報告した方法に準じて開発されたものであり、日本初の技術で製品化された



Cultured epidermis (Jace®)



Cultured cartilage (Jacc®)

Figure 1-2. Examples of regenerative medicine products.

初めての再生医療製品である²⁸。この他にも、筋肉組織などの比較的単純な構造の組織の治療を目指した治療法が保険適用を受けて実用化されている²³。近年では、人工多能性幹細胞（Induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞）が樹立されたことによって、本分野への期待がさらに高まっている²⁹。iPS 細胞を用いた再生医療に向けた研究は急速に発展しており、細胞種によっては iPS 細胞を分化誘導させて所望の細胞を生産する方法が確立されている³⁰⁻³²。さらに、iPS 由来細胞の動物への移植は盛んに行われており、ヒトへの臨床応用もすでに始まっている³³⁻³⁶。

世界で初めて iPS 細胞を人体に移植した臨床研究の例として、加齢黄斑変性に対する自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮シート移植が報告されている。既存の治療では十分な効果が得られていない患者の皮膚由来の iPS 細胞を誘導し、シート状の細胞を作製、この自己 iPS 細胞由来網膜色素上皮細胞シートを網膜に移植した。2014年9月に1人（女性）に移植を実施したところ、1年後の評価において、腫瘍形成、拒絶などは認められず、移植手術前の視力を維持していた。すなわち、安全性試験としての経過は良好であった³⁶。

2018年には、とくに実用化に近い治療として、健常者の細胞を用いて樹立した iPS 細胞から神経細胞を生成し、これをパーキンソン病の患者の脳に移植する臨床研究が始まった。本治療では、他人の細胞を移植するため、免疫抑制剤を服用する必要があるものの、症状を根治できる可能性があるとして、保険適用を目指している。これが保険適用に至れば、iPS 細胞を用いた再生医療の治療として、世界初の例となる³⁷。

以上に述べたように、再生医療およびその周辺産業には大きな期待が寄せられており、経済産業省の試算によると、Figure 1-3 に示すように、再生医療およびその周辺産業の今後の市場規模は拡大の一途をたどる³⁸。2050年には国内で1.3兆円、世界中で15兆円に達する見込みである。しかし、再生医療には必ず必要となる細胞培養プロセスには課題が多く、治療効果のボトルネックになっている。具体的には、培養中の細胞周囲の環境が生体内と異なることによって機能が消失（細胞が脱分化）すること、および培養した細胞を回収する際に用いるタンパク質分解酵素が細胞の活性を低下させることなどが課題である^{39,40}。

1.2 細胞培養プロセスにおける課題

前項では、細胞を用いた医療について紹介した。すでに述べたように、細胞を用いた医療はその有用性が多く報告されているが、いずれの例でも細胞の培養プロセスに課題がある。本項では従来の細胞培養プロセスとその課題について述べる。細胞には接着性細胞と浮遊性細胞が存在するが、血球系の細胞など一部の細胞を除いた細胞は接着性であるため、本研究では接着性細胞を対象とする。接着性細胞は単体で浮遊した状態では生存できず、自身以外の何かに接着した状態で培養する必要がある。

1.2.1 細胞培養方法の課題

細胞を生体外に置いて維持する，すなわち培養する一般的な方法として，浮遊培養と接着培養が存在する．浮遊培養とは細胞を塊状にして培養する方法である．細胞非接着の表面を有する細胞培養容器に細胞を播種することによって，細胞同士を接着させて培養する．一方で，接着培養は人工的な基質で構成された細胞接着性が高い培養面に細胞を接着させて，単

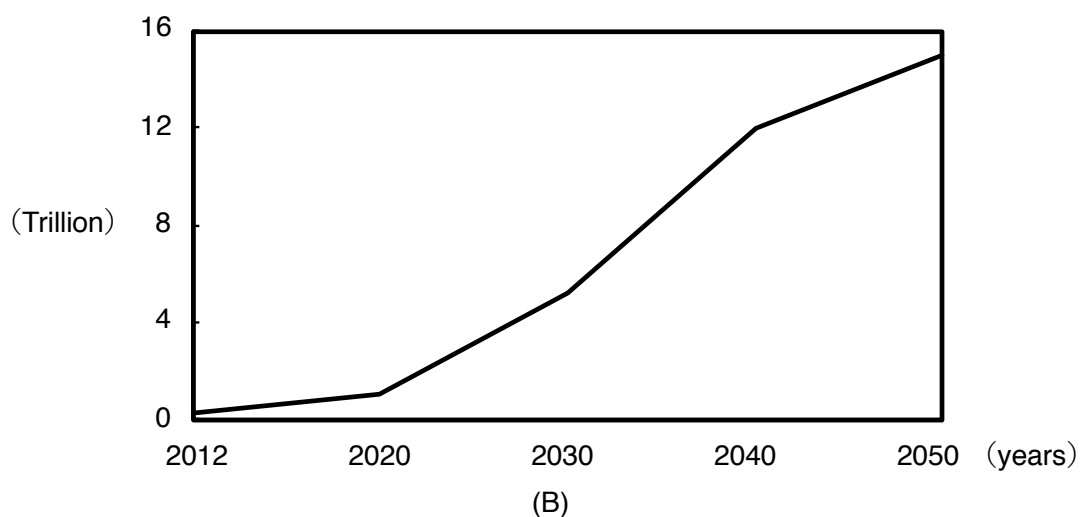
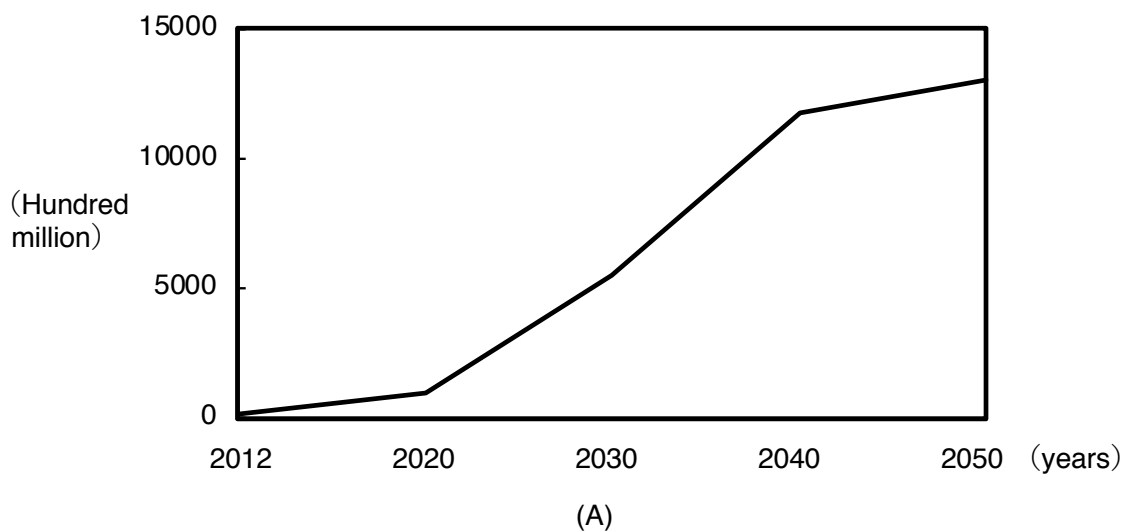


Figure 1-3. Predication of a market size of regenerative medicine and its peripheral industry in future (A) Japan (B) Globe

層で細胞を培養する方法である。それぞれの培養方法における細胞培養プロセスの例を Figure 1-4 および Figure 1-5 に示す。

浮遊培養では細胞は 3 次元的に他の細胞と接着して培養される。生体内における細胞は 3 次元的に周囲の細胞に接着しており、接着培養と比較して細胞が本来の機能を維持しやすいという特徴がある。さらに、Figure 1-4 に示すように攪拌を行うことによって容易にスケールアップが行えるため、細胞培養の産業化を鑑みた際に有効な手法である⁴¹。しかし、適用できる細胞種に制限があることに加えて、容易に細胞の状態を確認することができないこと、攪拌や細胞塊の大きさなど細胞の状態に影響がある因子を制御することが困難であることなどが問題として挙げられる。細胞の品質を管理することは、医療の安全性に関わる重要な課題であり、医療応用に向けた課題が残る。

一方、接着培養では、細胞接着性の優れた培養面を有する細胞培養容器に細胞を播種し、細胞を培養面に接着させる。培養面に接着した細胞は増殖を開始するが、細胞同士が接触すると接触障害（コンタクトインヒビション）が発生し、細胞の増殖がとまり機能性が変化することが知られている⁴²⁻⁴⁴。細胞数を獲得する目的で細胞を培養する際は、これを防ぐために、タンパク質分解酵素の1つであるトリプシンを用いて、細胞接着に関するタンパク質を分解することで細胞を培養面から剥離し、細胞同士も分散させてシングルセルの状態に戻して濃度を調整した後に再播種することになる。このプロセスを継代と呼ぶ。継代のプロセ

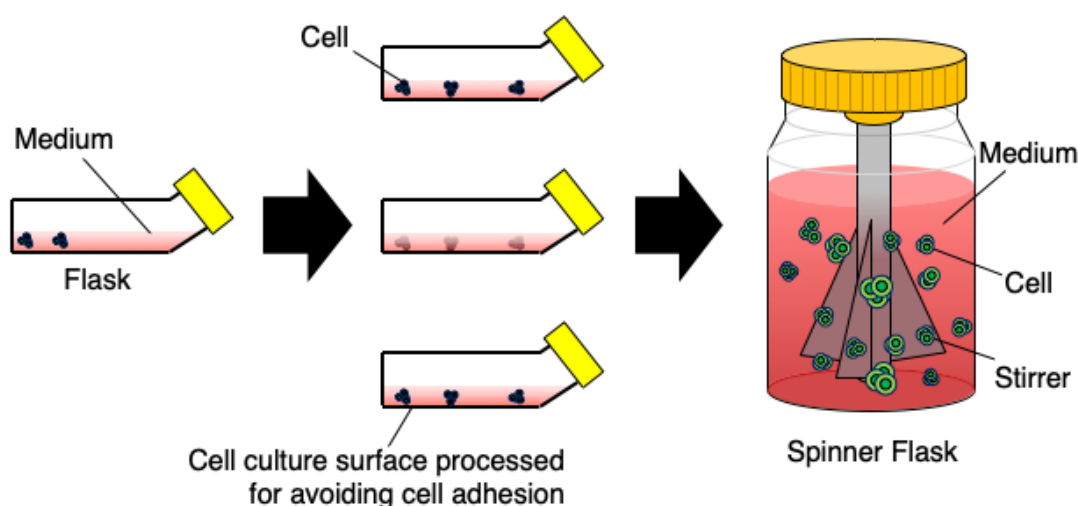


Figure 1-4. Process of suspension culture

スを Figure 1-6 に示す. この作業を繰り返すことで細胞を維持, 増殖させていく. 接着培養において, 細胞は単層で培養されるため, 倒立顕微鏡を用いて容易に細胞の状態を確認できること, ほとんど全ての接着性細胞に適用できることが長所として挙げられる. このため, 医療に応用される細胞の多くが接着培養されている.

しかし, 生体内における細胞が3次元的に他の細胞や基質に接着していることを鑑みると, 培養環境が生体内と大きく異なる培養法であることは自明である. 実際に, 接着培養された細胞はその機能性を容易に失う(脱分化する)ことが報告されている^{29,45}. 1.1.2 項および 1.1.3 項で言及した創薬スクリーニングおよび再生医療に細胞を応用するためには, 細胞が本来の

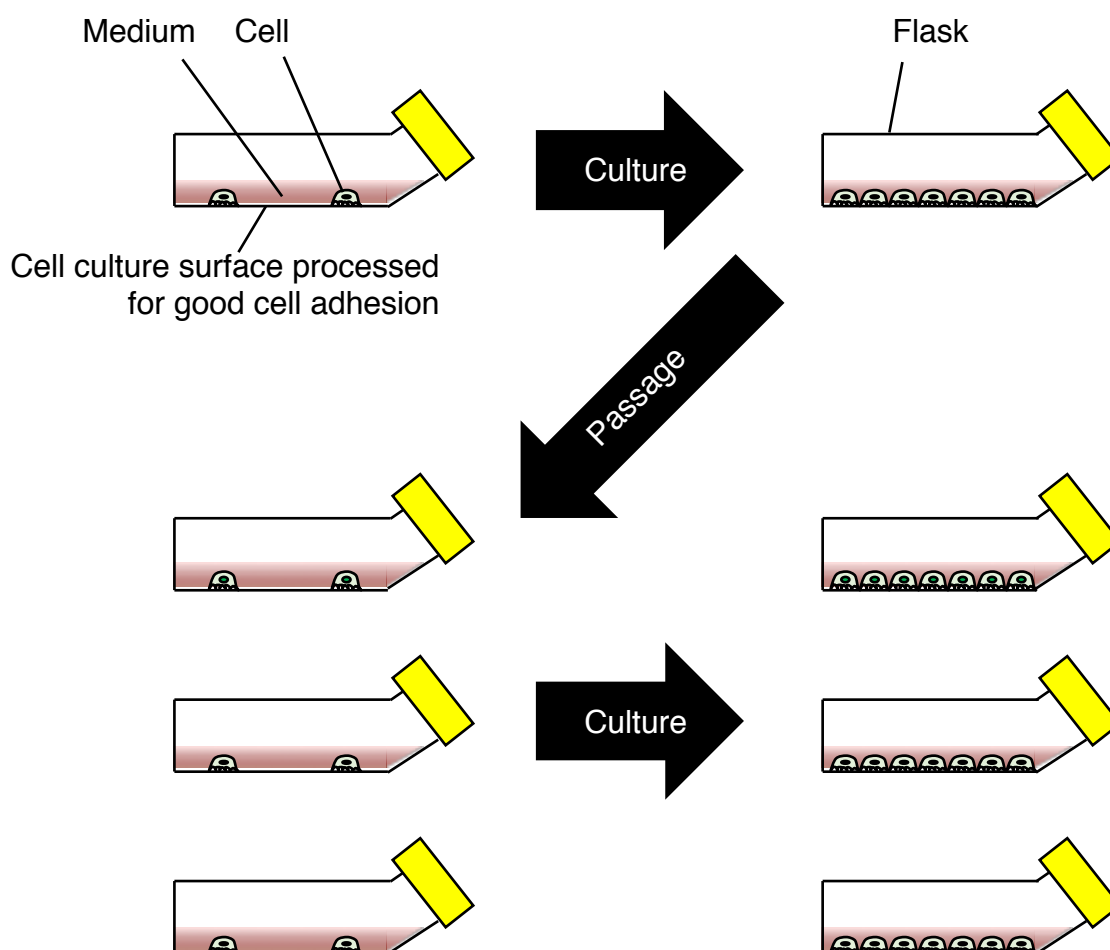


Figure 1-5. Process of adhesion culture

機能性を保っている必要がある。細胞の機能性は周囲の環境に大きく影響を受けるため、細胞を生体内の環境に近づけて培養することで細胞の機能性を高く保つことができる。しかし、通常の接着培養では、培養容器に細胞を無作為に播種するため、細胞同士の位置関係はランダムであり、制御することはできない。これにより、細胞周囲の環境が生体内と大きく異なり、脱分化が促進される可能性がある。さらに、1.1.1項で述べたバイオテクノロジー応用医薬品への応用では細胞に特定のタンパク質を生成させる必要があるため、全ての細胞の機能性を一定に保つ必要がある。すでに述べたとおり、細胞同士の位置関係が制御できない従来の接着培養法では、これは不可能である。こうした背景の中、細胞同士の位置関係を培養面上で制御する技術である細胞パターンニングに関する研究が盛んに行われてきた。具体的な先行研究とその成果を1.3節で詳細に紹介する。

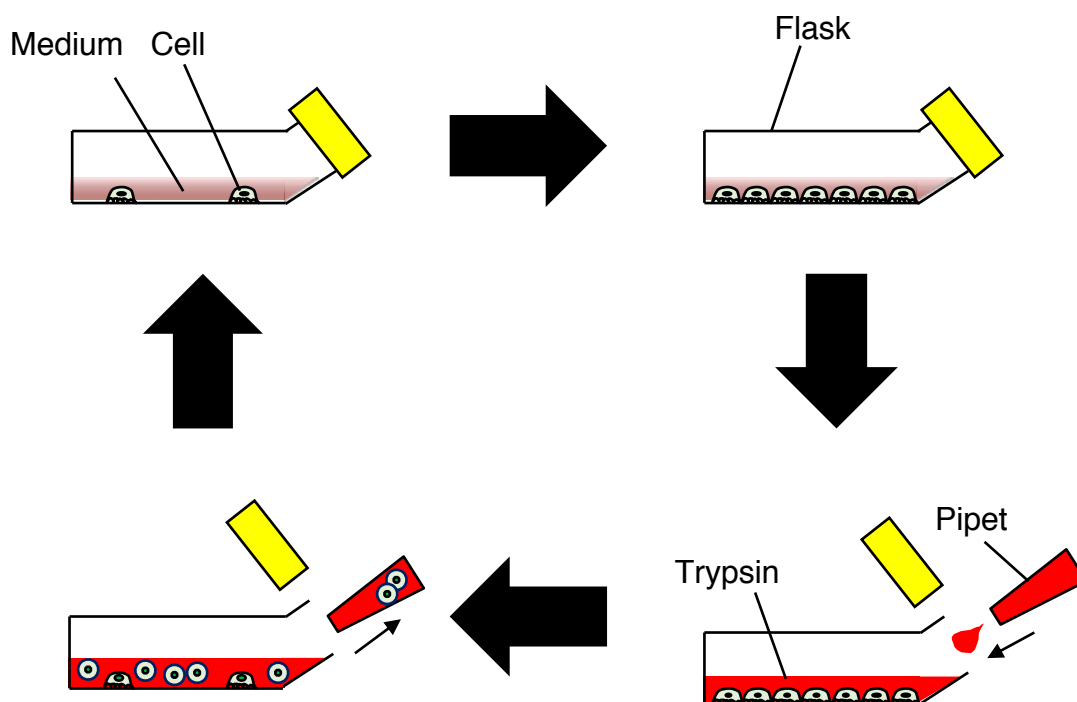
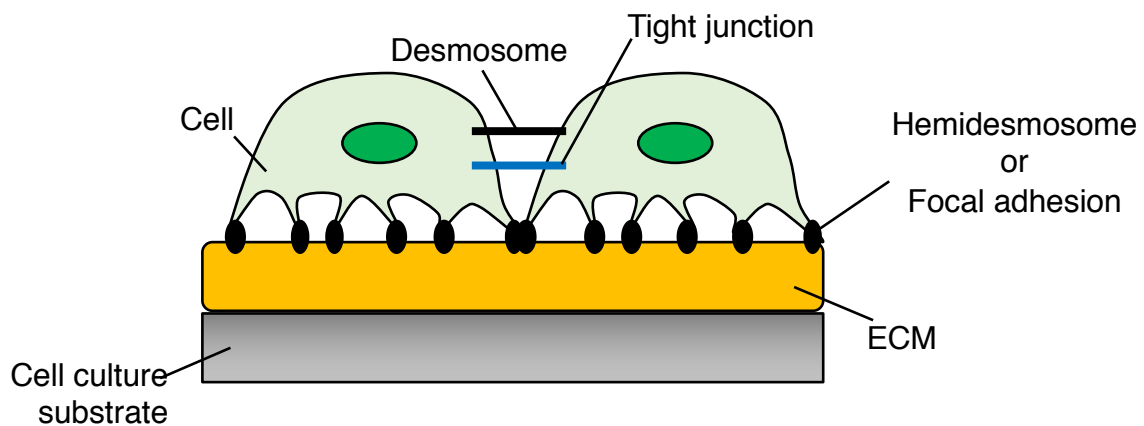


Figure 1-6. Process of passage culture

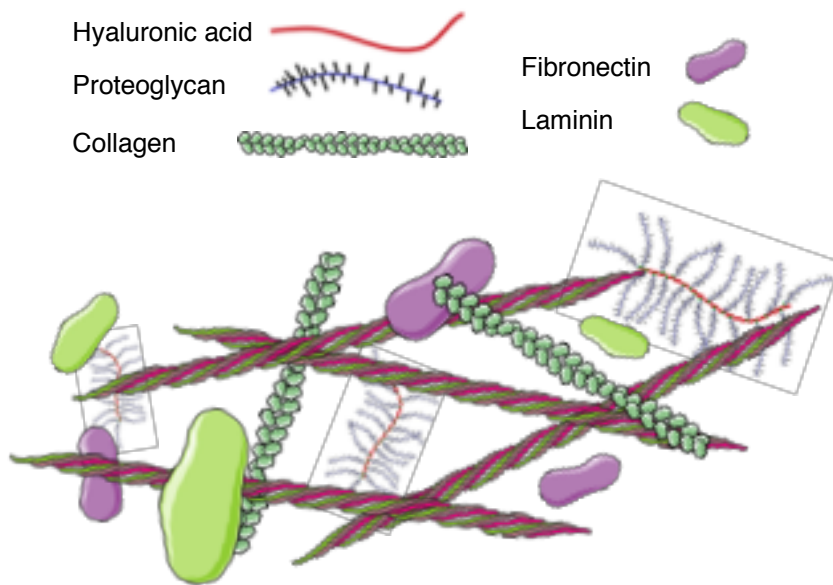
1.2.2 細胞回収方法の課題

前項で述べたように、現在の細胞培養では接着培養法が一般的に用いられている。接着培養で培養した細胞を再生医療に応用する際には、継代の際と同様に、培養面に接着した細胞を回収する必要がある。細胞-細胞間接着および細胞-培養面間接着は、どちらも細胞が自ら生成したタンパク質によって形成される⁴⁶⁻⁴⁸。より詳細に述べると、細胞同士の接着は密着結合 (tight junction) や接着班 (desmosome) などから形成される⁴⁹⁻⁵¹。一方で、細胞と培養面との接着は直接的には形成されない。細胞から生成された細胞外マトリクス (Extra Cellular Matrix: ECM) が培養面に層を形成し、その細胞外マトリクスと細胞の間に半接着班 (hemidesmosome) を形成することで細胞は培養面に接着する⁵²。なお、細胞外マトリクスはコラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどから構成されているが、これらの成分比等は細胞種により異なる⁴⁷⁻⁴⁹。この細胞の接着機構を Figure 1-7 に示す。

初期の再生医療では、継代過程と同様にトリプシンを用いて細胞を剥離、回収して、シングルセルの状態にして移植を試みていた⁵⁶。例えば、軟骨欠損部を持つ患者の正常な軟骨細胞を採取し、培養して移植することで治療を試みる再生医療の治療では、シングルセルの状態に細胞を体内に移植していた⁵⁶。この結果、細胞の生着率が低く、十分な治療効果は得られなかった。これは、トリプシンによって細胞外マトリクスが分解されていることに起因する。さらに、シングルセルの状態では、医師によるハンドリングが難しいという、外科的な理由も生着性を低下させる要因となっている。そこで、人工的な細胞外マトリクスの1つであるアテロコラーゲンゲルに細胞を包埋した状態で移植する治療方法が開発された⁵⁷。この治療法では、細胞がすでに細胞外マトリクスに包埋されているため漏出することもなく、ある程度の大きさの塊状であるため医師によるハンドリングも容易であった。本手法は2013年に保険適用され、Figure 1-2 に示すように自家培養軟骨ジャック[®]として製品化されている⁵⁸。しかし、細胞種によっては、細胞密度が高い状態で移植する必要があり、そういった場合はアテロコラーゲンゲルなどの人工的な細胞外マトリクスを使用することは推奨されない。こういった背景から、培養していた細胞をトリプシンなどのタンパク質分解酵素を用いずに剥離、回収する方法が必要とされてきた。そこで、酵素フリーで細胞を剥離する技術に関する研究が盛んに行われてきた。コンフルーエントまで培養した細胞を酵素フリーで剥離することによって、細胞外マトリクスだけではなく、細胞間の接着を形成するタンパク質も分解されないため、細胞がシート状に剥離されることが知られている。このようにシート状に細胞を回収することによって、移植した際の細胞の生着性も高く、ハンドリングも容易である。さらに、Figure 1-8 に示すように細胞シートを積層することで3次元細胞組織を生成することも可能であり、再生医療だけではなくバイオテクノロジー応用医薬品を開発する際の細胞培養技術や、薬剤スクリーニングの際のアッセイで用いられる生体外における組織生成にも応用が



Simple overview of cell adhesion



Detail image of ECM

Figure 1-7. Schematic image of cell adhesion

期待されている⁵⁹⁻⁶³。実際に、細胞シートを積層させることで細胞組織の機能性が向上したという例が多数報告されている。

具体的な細胞シートの剥離に関する先行研究に関しては1.4節において詳細に紹介する。

1.3 細胞パターニングの先行研究

本節では、培養面上において単層で培養される細胞に対する細胞パターニング技術の目的と現状について述べる。骨格筋組織の細胞である筋芽細胞は直線上にパターニングして培養することで、細胞の配向性が高い骨格筋組織が生成されるため、機能性が高い細胞組織の生成に有効であり、円環状にパターニングすることで外肛門括約筋組織の生成に有効であると考えられる⁶⁴。また、心筋細胞を円環状にパターニングすることで、心不全を引き起こす際のリエントリー回路を模擬でき、薬剤スクリーニングに資すると考えられる。さらに複雑な形状のパターニングだと、幹細胞を放射状にパターニングして培養することで、肝小葉の機能が復元されることが報告されている⁶⁵。しかし、こういった細胞パターニング技術を用いて生成した細胞組織は、様々な理由から実用段階には至っていない。本節では、細胞パターニング技術の先行研究を紹介し、それぞれの長所と短所を考察することによって、細胞パターニング技術の医療応用を可能にする方策を探る。

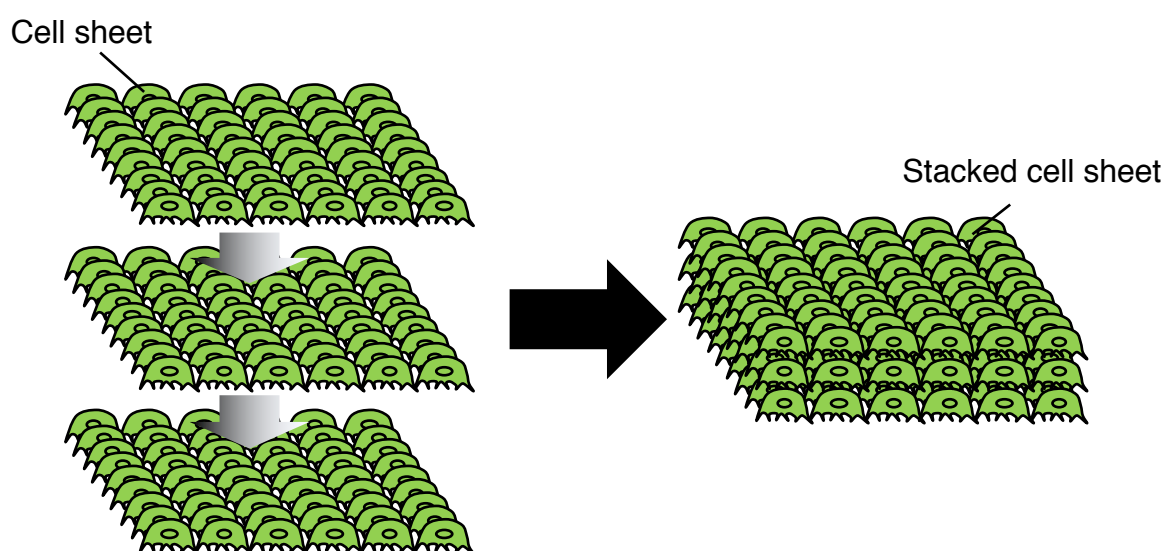


Figure 1-8. Multilayered cell sheet for 3D tissue fabrication *in vitro*

1.3.1 バイオプリンタによる細胞パターンニング

所望の位置に細胞をパターンニングする方法として、バイオプリンタによるパターンニング技術が報告されている。バイオプリンタとはインクジェットプリンタの技術を応用した技術である。従来のインクジェットプリンタがノズルからインクを射出して印刷物をプリントするのに対して、バイオプリンタはノズルからインクの代わりに細胞を包埋したコラーゲンゲルなどの人工的な細胞外マトリクスを射出する。Figure 1-9 にバイオプリンタを用いた細胞パターンニングの模式図を示す。この方法によって、細胞にほとんど害を与えることなく、所望の位置に細胞をパターンニングできると言われている。

しかし、コラーゲンゲルなどの人工的な細胞マトリクスに細胞を包埋する方法では以下のような問題が予想される。人工的な細胞外マトリクスが細胞の機能性に影響を与えうるため、細胞の機能が生体内と異なる可能性がある⁶⁶。このため、薬剤スクリーニングにおいて結果の信頼度が低下する。再生医療の治療においては移植したのちコラーゲンゲルが患者の生体内に吸収される際に炎症反応を起こす危険がある。また、人工的な細胞マトリクスであるコラーゲンゲルを使用するため、筋肉組織のように細胞密度が高い細胞のパターンニングには不向きである。さらに、細胞とバイオプリンタとの接触部分が多く、目的の細胞と異なる他細

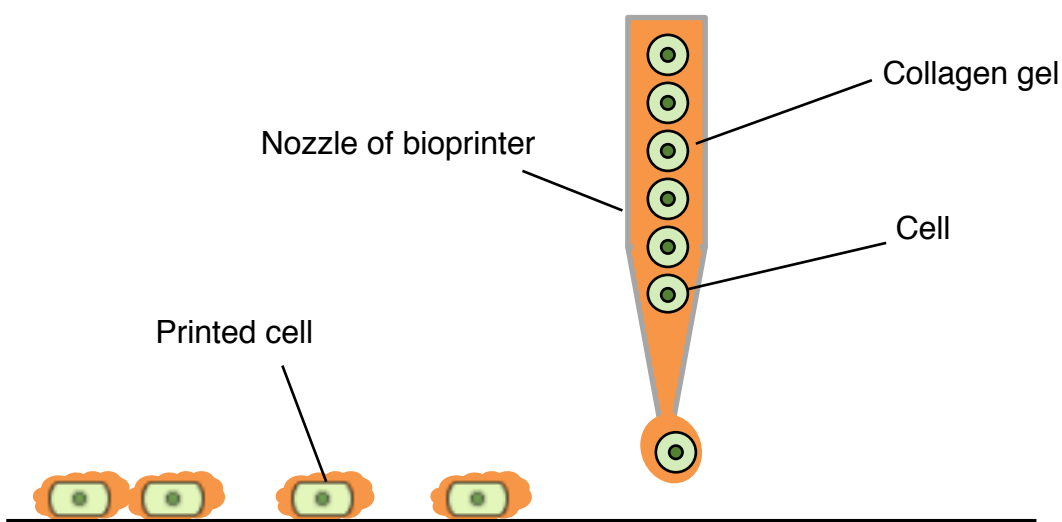


Figure 1-9. Schematic image of bioprinting

胞や細菌が混入するクロスコンタミネーションおよびコンタミネーションを起こす危険性が高い。これを防止するためには、装置が細胞に接触する部分を全て交換する、もしくは全部品を洗浄、滅菌する必要があるため、これによるコストの増加も課題である。さらに、細胞種によって適切な細胞外マトリクスが異なることも課題である^{61,62}。

1.3.2 磁気標識によるパターンニング

パターンニングする細胞を大掛かりな装置に接触させることも、人工的な細胞外マトリクスに細胞を包埋することも無く細胞をパターンニングする技術として、磁力によって細胞をパターンニングする技術が報告されている⁶⁹⁻⁷¹。この技術の概念図を Figure 1-10 に示す。この技術

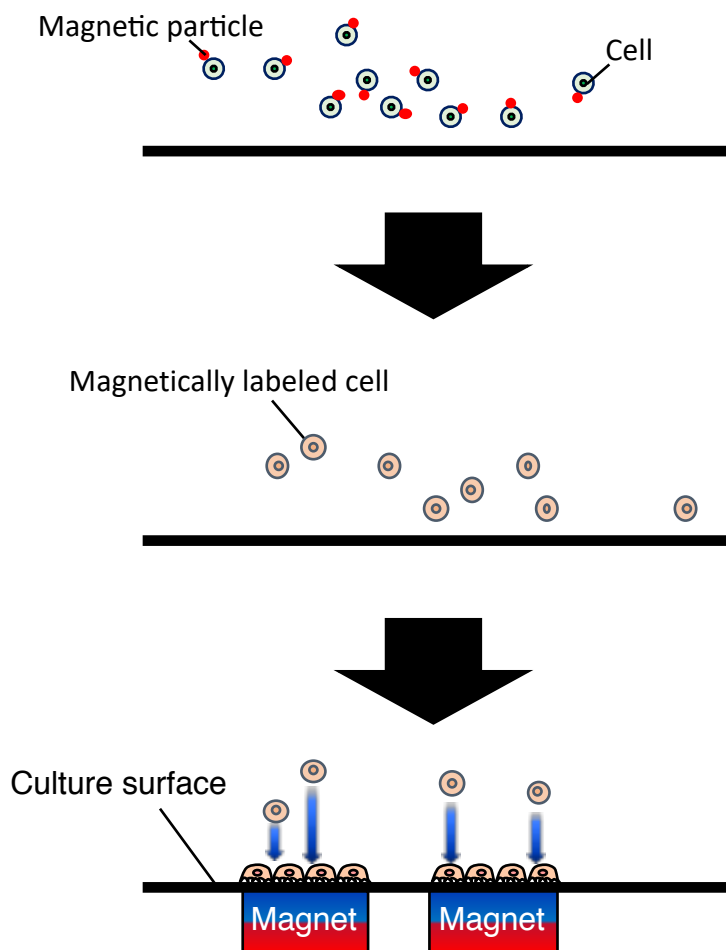


Figure 1-10. Schematic image of cell manipulation using magnetic particles

では磁性ナノ粒子を細胞に取り込ませることによって細胞に磁気標識を施し、この細胞を磁力により磁石に引き寄せてパターンニングする。この技術ならば、密度の高い組織の生成も可能である。さらに、細胞に導入した磁性ナノ粒子は細胞毒性がないと報告されている。しかし、細胞に対して不純物を導入しているということは事実である。このため、バイオテクノロジー医薬品を生成する際はコンタミネーションのリスクが上がり、薬剤スクリーニングアッセイにあたっては、薬剤への反応の妥当性という観点で懸念がある。さらに、再生医療の治療にあたっては、生体内に移植した際の反応が不明である。こういった要因から実用化には至っていない。

1.3.3 培養面の表面改質によるパターンニング

人工的な細胞外マトリクスに細胞を包埋しないため、細胞密度が高い組織を生成することが可能で、かつ細胞に不純物を導入することもない方法として、培養面の表面改質による細胞のパターンニング技術が報告されている^{72,73}。この手法では、細胞の培養面に対して加工を施し、細胞の接着位置を制御する。例えば、ポリジメチルシロキサン (PDMS) をはじめとした細胞が本来は接着しにくい高分子材料に対して、コラーゲンゲルや人工的な細胞外マトリクスをパターンニングすることによって、この位置にのみ細胞を接着させる方法が知られている (Figure 1-11)。また、細胞接着性の培養面に対して、細胞が接着しないようにウシ血清アル

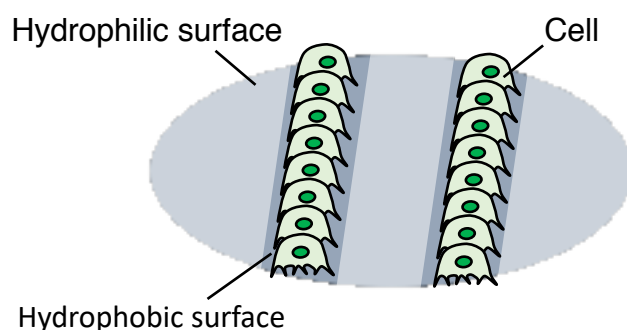


Figure 1-11. Schematic image of cell patterning using surface modification

ブミン (Bovine serum albumin: BSA) のパターンニングを行う方法も報告されている⁷³.

しかし、これらの方法では培養面に対して化学物質を修飾する必要があり、生成した細胞組織、および実験環境に影響を及ぼすことやコンタミネーションのリスクが懸念される。このため、バイオテクノロジー医薬品の製造、薬剤スクリーニングアッセイや再生医療の治療には適さない。

1.3.4 定在波によるパターンニング

介在物も化学物質も用いずに細胞をパターンニングする手法として、定在波を用いた手法が報告されている。液中に超音波を対向させて照射して定在波を発生させ、圧力の変化が最も小さい定在波の節に微小物体を捕捉できることが古くから報告されている。Gesellchen et al.やGuo et al.などは上記のマニピュレーション方法を細胞パターンニングに応用している⁷⁴⁻⁷⁶。Gesellchen et al.の研究で用いられた細胞パターンニングデバイスの概略図を Figure 1-12 に示す。

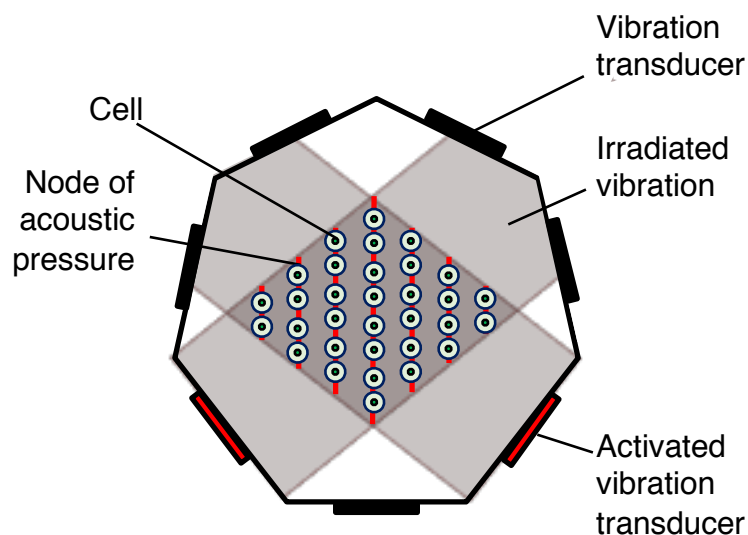


Figure 1-12. Schematic image of cell patterning using standing wave

この装置では、超音波を正面ではなく、角度をずらして照射して振動の節を形成し、その位置に細胞を捕捉して配置する。本装置を用いることで細胞を周期的な直線状にマニピュレートすることができる。この手法を用いることで化学物質を培養環境に導入することなく、細胞をパターンニングできる。しかし、生成する細胞組織の形状が限定的であること、超音波が伝播する領域が狭いため極めて限定的な範囲に存在する細胞のパターンニングしか出来ないことなどが課題として挙げられている。これは、本デバイスが側面からの超音波照射によって直線的な形状の定在波の節を形成することに起因する。しかし、1.3節でも述べたように、細胞種によっては、円状や放射状などの形状にパターンニングする必要がある。さらに、再生医療に用いるためには、コンタミネーションの防止や光学顕微鏡による観察が必要という観点から、汎用的な細胞培養容器内における培養が必要とされるが、汎用的な細胞培養容器内で定在波により細胞パターンニングを実施した例は報告されていない。このことから、本手法は医療分野への実用化に至っていない。

1.3.5 各パターンニング手法の比較

ここで、本節で紹介した細胞パターンニング手法それぞれの特徴を比較する。Table 1-1 に各パターンニング手法の特徴を示す。本表から分かるように、それぞれの手法には長所と短所がある。形状の自由度やパターンニングの解像度が高い手法は有用であるが、いずれも特殊な培養環境を必要とすると言える。細胞パターンニング手法を広く普及するには、汎用的な培養環境で簡便にパターンニングが行え、ランニングコストも低いパターンニング手法を実現することが重要であると考えられる。

1.4 細胞シート剥離の先行研究

本節では、酵素フリーで細胞をシート状に剥離する先行研究について詳細に述べる。さらに、それぞれの技術の長所と短所を考察することで、現在必要とされている技術を明らかにする。

1.4.1 温度応答性ポリマを用いた細胞シートの剥離

本項では、温度応答性ポリマを用いた細胞シートの剥離について述べる。温度応答性ポリマとは、水中で下限臨界溶液温度（Lower Critical Solution temperature: LCST）をもつポリマである⁷⁷。下限臨界溶液温度を境界として、それ以上の温度では分子内、または分子間の疎水結合が強まりポリマ鎖が凝集する。一方で、下限臨界溶液温度以下ではポリマ鎖が水分子を結合し水和するという特徴を持つ。すなわち、相転移挙動を示すポリマを温度応答性ポリマと呼ぶ。この相転移現象は可逆的であるため、多くの分野でスイッチング基剤としての活用が期待されている^{78,79}。

本手法では、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド) (Poly(N-isopropylacrylamide): PNIPAM) という温度応答性ポリマの1つを修飾した培養面から細胞を剥離する。本ポリマの下限臨界

Table. 1-1 Comparison of each method

Method	Freedom degree	Resolution	Initial cost	Running cost	Culture environment	The amount of user's work
Bio printing	◎	◎	× (Complex equipment)	× (maintain germfree condition in an equipment)	× (Complex equipment and artificial 3D gel)	◎
Magnetic particles	◎	◎	◎	○	× (Introduce magnetic particles)	○
Surface modification	◎	◎	◎	○ (Making surface patterning)	△ (Applying chemical substances on culture surface)	× (Making surface patterning)
High frequency ultrasound	× (Limited to line or dot shape)	◎	× (Special device)	× (Special device)	× (Special device)	◎

溶液温度は 32°C である。すなわち、通常の細胞培養温度である 37°C において、細胞は通常通り接着、培養される。一方で、培養温度を 20°C にすると、培養面が細胞非接着性に変化するため、細胞が剥離する^{80,81}。Figure 1-13 に示すように、細胞を培養面上でコンフルエントまで培養してモノレイヤーを形成した後に、タンパク質分解酵素を用いずに剥離することで細胞シートが生成できる。

本手法は、細胞シートを用いた再生医療や創薬スクリーニングに用いる細胞組織の生成に広く利用されており、細胞シート工学と呼ばれる概念を作り出すきっかけとなった。とくに、再生医療への応用については実用化が進んでおり、TERUMO が販売しているハートシート[®] (Figure 1-14) をはじめとして、保険適用されている製品も存在する⁸²⁻⁸⁴。本研究によって、細胞を用いた医療は飛躍的に進化したことは明らかである。しかし、温度応答性ポリマを用いた細胞シートの剥離手法には、大きく分けて 2 つの課題がある。それは、細胞シートを剥離する際に温度の低下が必要であることと、温度応答性ポリマを培養面に修飾する必要がある

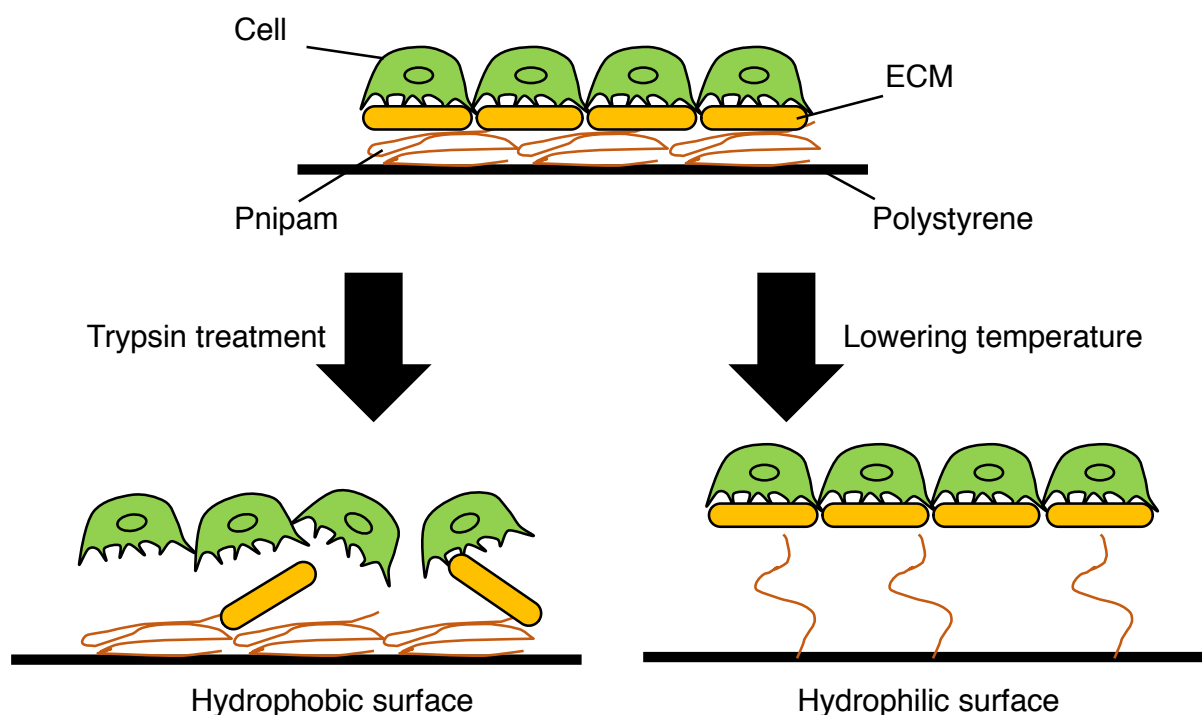
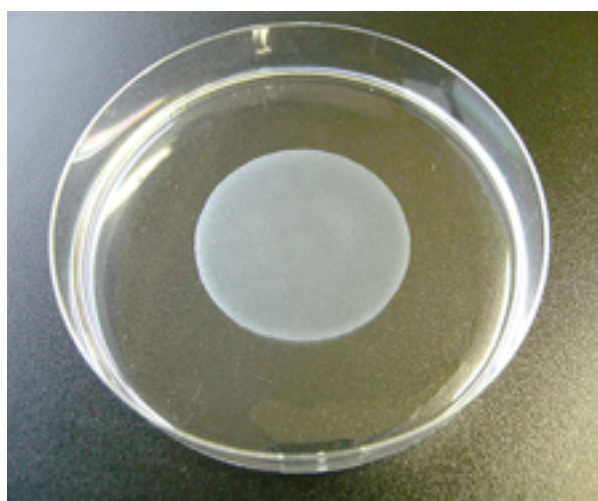


Figure 1-13. Principle of fabricating cell sheet using Poly(N-isopropylacrylamide) coated culture dish

ることである。温度を低下することによって、細胞の活性が低下する可能性が示唆されている⁸⁵⁻⁸⁸。さらに、特殊な細胞培養ディッシュが必要であるため、通常の培養ディッシュを使用する際と比較してコストが高くなることと、特殊な培養法が必要になることが課題である。本手法は実際に医療応用されているが、こういった課題を克服するため、現在も様々な手法による細胞シートの剥離手法が研究、開発されている⁸⁹。

1.4.2 金-チオール反応を用いた細胞シートの剥離

タンパク質分解酵素を用いずに細胞を剥離する手法として、金-チオール反応を用いた手法が報告されている⁹⁰⁻⁹²。本手法では、金で構成された細胞培養表面に対して、チオール基を介してアルカンチオール分子などを接着させる。その後、接着した分子はファンデルワールス力によって、自己組織化単分子膜 (Self-assembled monolayer) を形成する。ここで、分子の末端に細胞接着能を有する RDG モチーフを修飾することにより、細胞は自己組織化単分子膜を介して金で構成される培養表面に接着可能となる。本手法では、このようにして細胞を接着させた後に、電気化学的脱離によって、細胞シートを剥離する。細胞培養面に負の電圧を印加すると金表面からチオール基が脱離するため、自己組織化単分子膜が金表面から脱離する。これが電気化学的脱離である。電気化学的脱離法のプロセスを Figure 1-15 に示す。負の電圧を5分ほど印加することで、アルカンチオール分子が接着した細胞シートを剥離することが可能であった。しかし、アルカンチオール分子の生体適合性の低さが課題である。



<https://www.terumo.co.jp/medical/regenerative/heartsheet.html>

Figure 1-14. Heart sheet sold by TERUMO CORPORATION.

一方で、アルカンチオール代わりに、オリゴペプチドを用いた手法が開発された⁹³。オリゴペプチドは分解されてもアミノ酸を排出する物質であり、生体適合性が高い。さらに、培養面からの脱離も最短で2分と報告されている。しかし、本手法は2つの課題がある。まず、細胞培養面が金で構成されているため、培養容器のコストが高くなる上に、金は光透過性がないため、位相差顕微鏡を用いた細胞の観察が困難である。さらに、細胞に電圧を印加することから、印加電圧が細胞に与える影響が懸念される。事実、電圧印加によって細胞の挙動をコントロールできることが先行研究から示されている^{94,95}。

本手法は短時間で細胞シートを剥離できる手法ではあるが、手法が細胞に与える影響が懸念されており、医療への実用化に向けて課題を有している。

1.4.3 高分子電解質を用いた細胞シートの剥離

前項と類似した方法に高分子電解質を用いた細胞シートの剥離手法がある (Figure 1-16)^{96,97}。紫外線処理を施した直後の培養ディッシュに対して、PEI-(HA/PLL)₁₀などの高分子電解

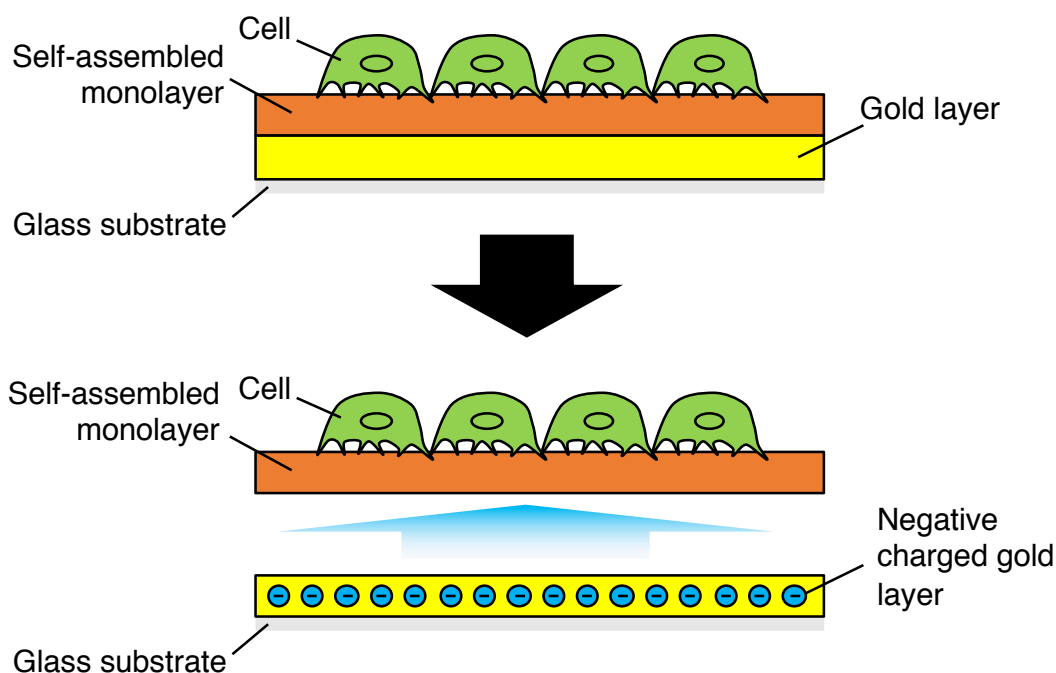


Figure 1-15. Principle of fabricating cell sheet using gold-thiol reaction

質を多重にコートする。これにより、細胞が接着可能でかつ細胞にとって適切な弾性率を有する人工的な細胞外マトリクスを構成する。その上に細胞を播種して、コンフルエントなモノレイヤーを構成するまで培養する。その後、フェロシアン化物 [hexacyanoferrate(II)(ferrocyanide)] を添加することで、PEI-(HA/PLL)₁₀ を融解させ、細胞と培養面との接着を切断し、細胞シートを回収する。本手法は汎用的な細胞培養容器に対して応用可能という長所がある。一方で、短所としては、細胞を播種、培養する前に高分子電解質

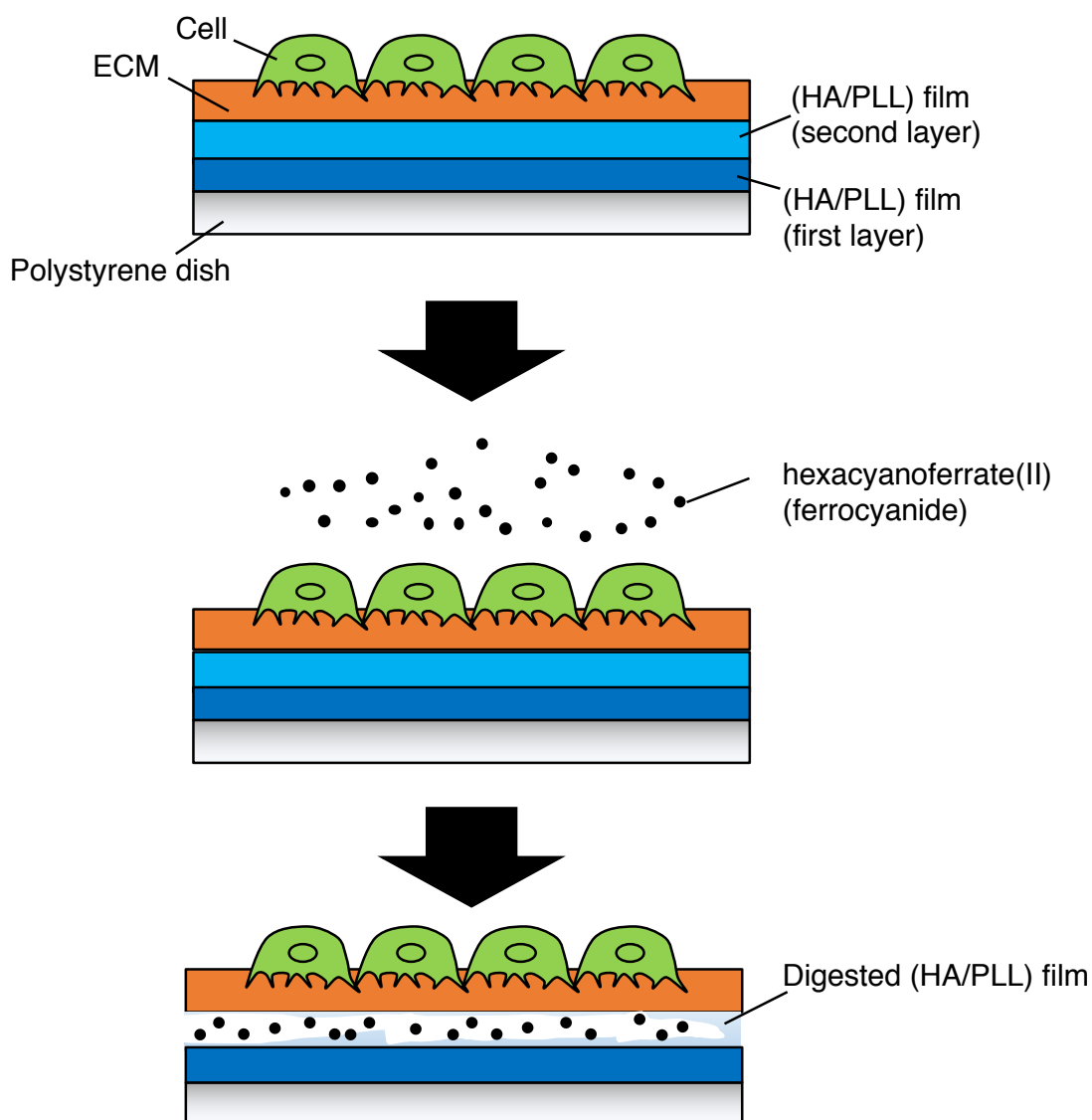


Figure 1-16. Principle of fabricating cell sheet using polyelectrolyte

を多重にコーティングする必要がある点, さらには, 高分子電解質を融解する際に用いるフェロシアン化物に毒性がある点が挙げられる. このため, 医療応用には至っていない.

1.4.4 光応答性基材を用いた細胞シートの剥離

人工的な細胞外マトリクスの層を融解するために毒性のある化合物を用いない方法として, 光応答性ポリマを用いた細胞シートの剥離方法が報告されている⁹⁸. 本手法では, 酸化チタン(IV) (titanium dioxide: TiO₂) などの, 光の照射に応答して親水性を変化させる物質で生体適合性のある物質を培養面にコーティングする. そこで細胞を培養した後に, 適切な波長の光を照射することで細胞を剥離することができる. ただし, 本手法では, 培養面から全ての細胞を剥離することはできないため, 今までに紹介した事例のように, 細胞シートを剥離することができない. さらに, 培養面へのコーティングが必要であることも短所である. このため, 医療には適用されていない.

1.4.5 磁気ビーズを用いた細胞シートの生成

ここまでの先行研究では, 培養面の性質を変化させることで, 培養面上のモノレイヤーの細胞を細胞シートを剥離していた. 本項では, 培養面の性質を変化させずに細胞シートを剥離する方法として, 磁性ビーズを用いたものを紹介する. 本手法では, 他の手法と異なり, 最初から細胞を培養面に接着させない^{99,100}. 手法の概要を Figure 1-17 に示す. 細胞非接着性培養面を持つ細胞培養容器に, 磁性ビーズを導入した細胞を播種する. 培養容器の底面に磁石を配置することで細胞を磁力によって引き寄せた状態で培養し, 細胞同士の接着が構築された後に磁石を取り除くことで細胞シートを剥離する. この方法では, 細胞シートを剥離する際に, 化学刺激や物理刺激を細胞に加える必要がないが, 細胞に磁性ビーズを取り込ませる必要がある点, 特殊な培養容器が必要な点が短所である.

1.4.6 培地成分の調整による細胞シートの剥離

上記までに, 特殊な培養面や, 刺激に応答して融解または脱離する人工的な細胞外マトリクスを用いたり, 化学物質を培養環境に導入することによる細胞シートの剥離手法を紹介してきた. 本項では, 特殊な細胞培養容器を必要としない細胞シートの生成手法として, 培地成分を調整することによる細胞シートの剥離手法を紹介する. Ohnuma らは, 細胞の接着力に培地の成分が関係することを報告した¹⁰¹. Figure 1-18 に示すように, 培地中の Ca²⁺と Mg²⁺の濃度はそれぞれ, 細胞同士と細胞と細胞外マトリクスとの接着の強度と相関がある. これは,

細胞同士の接着に関する E-Cadherin の発現を Ca^{2+} が制御し、細胞と細胞外マトリクスの一つである Fibronectin との接着を Mg^{2+} が制御していることに起因する¹⁰²⁻¹⁰⁵。すなわち、培地内の Ca^{2+} 濃度を高くし、 Mg^{2+} の濃度を低くすることで、細胞がシート状に剥離する。ただし、本研究では、直径 1 mm 以下の小さい細胞シートの剥離を確認したにとどまっている。実際のバイオテクノロジー医薬品の生成や、薬剤スクリーニングに使用する細胞組織の生成、再

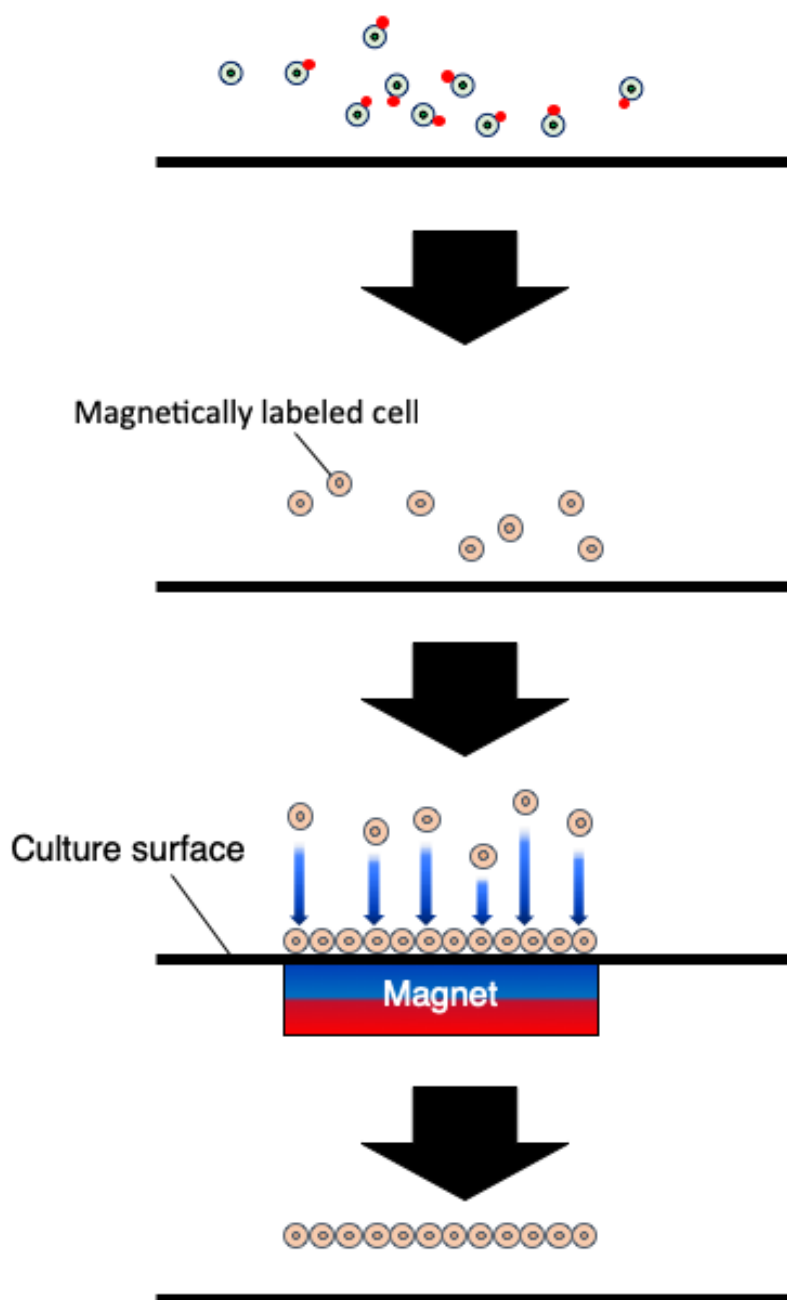


Figure 1-17. Principle of fabricating cell sheet using magnetic particles

生医療の治療では細胞数が重要なファクターになる。すなわち、大きな細胞シートを剥離する必要があるため、実用化には至っていない。さらに、本手法では、細胞シートを回収するためにテクニシャンによるピペッティングが必要になる。このようにテクニシャンの手技に依存する技術は汎用性に乏しいと考えられる。

1.5 細胞培養分野において超音波振動を用いた先行研究

1.3節および1.4節において、細胞培養プロセスにおける、細胞培養時と回収時の課題を解決する手法を紹介した。これらの手法における問題点として、汎用的な細胞培養容器が使えないこと、特殊な物質を培養環境に導入する必要がある点が主に挙げられる。一方、本研究

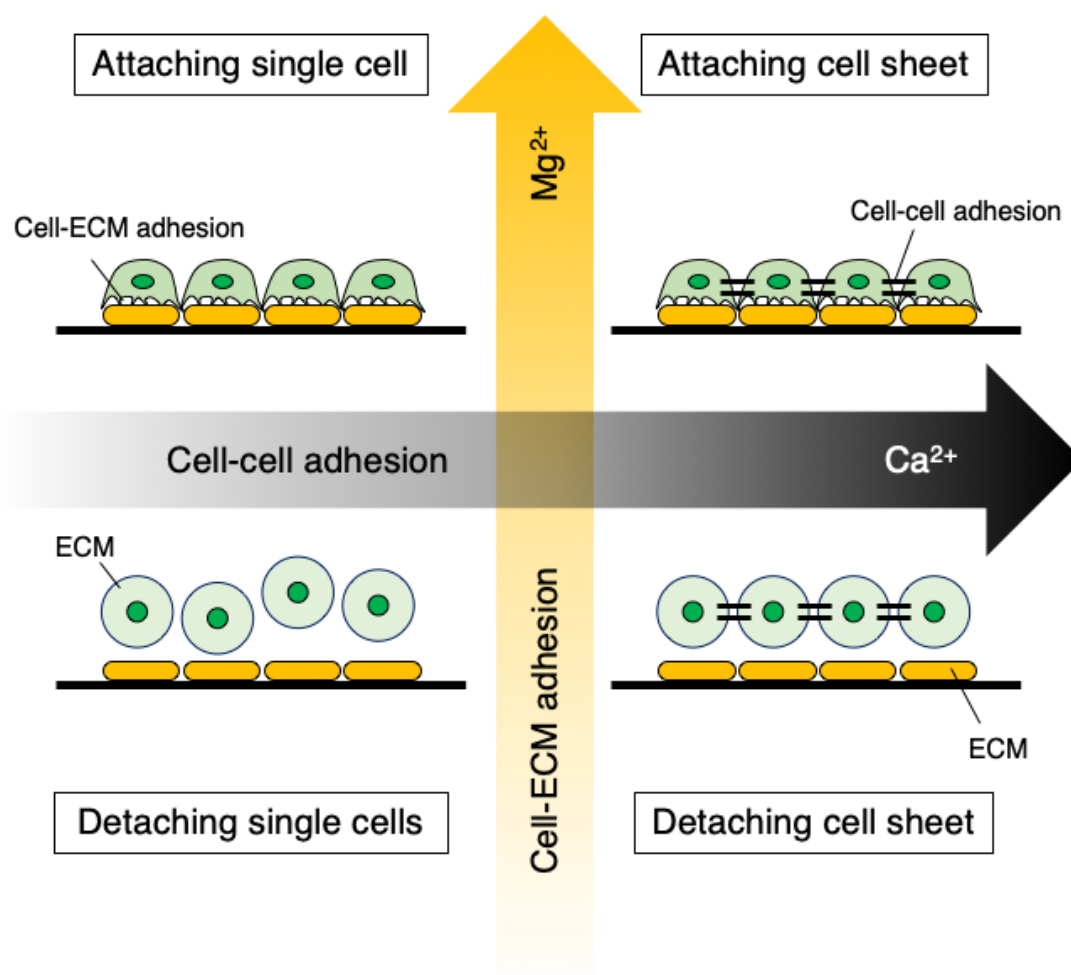


Figure 1-18. Schematic image of cell adhesion with each condition of Ca^{2+} and Mg^{2+}

では1.3.4項で紹介した超音波を用いた技術に着目した。1.3.4項の手法では、高分解能を有する細胞パターンングデバイスを実現するために特殊な細胞培養デバイスを用いているが、超音波を用いることで、培養環境に特殊な物質を導入することなく、細胞をマニピュレートすることができる。さらに、超音波の伝播特性を考慮すると汎用的な細胞培養容器の内部に対して超音波を伝播させることで細胞のマニピュレーションが可能であると考えられる^{106,107}。そこで、本節では、細胞培養における超音波振動の応用事例を紹介する。細胞に関する研究の中では、細胞を破碎してタンパク質等を抽出するために超音波振動が古くから使用されていた。さらに、近年では高密度焦点式超音波治療法（High Intensity Focused Ultrasound: HIFU）が注目されている。超音波を一点に集中して照射することで、体内の狙った箇所の細胞にのみ気泡振動を誘発し、キャビテーションによる力学的作用や熱力学的作用を引き起こすことができる¹⁰⁸。この現象を利用して、現在では結石の破壊やがん治療が行われている^{109,110}。しかし、本研究では、こうした細胞を破碎するキャビテーションを誘発しないために、強度が低い超音波を用いて生細胞のマニピュレーションを実行する。なお、生細胞のマニピュレーションに対する超音波の応用の多くは、現状では研究段階にある。

1.5.1 生体への医療応用

近年、超音波技術の発展によって、容易に出力の制御ができるようになってきた。これに伴って、外傷に対して超音波を照射することで治療期間を短縮できることが明らかになってきた。実用化されている例として、骨折に対する低出力超音波パルス（Low Intensity Pulsed Ultrasound: LIPUS）の照射が報告されている¹¹¹。MHz帯の超音波を断続的に患部に照射することで、細胞障害を起こすことなく細胞の活性を向上させ、骨折の治療に要する期間を短縮する。しかし、こうした技術が実用化されている一方で、その原理は細胞レベルでは解明されておらず、現在でも基礎研究が進められている。以降、1.5.2項—1.5.4項で紹介する研究は、これに対応する基礎研究として注目されている。

1.5.2 細胞の増殖性の向上

細胞は生体外で培養される際に、細胞分裂を繰り返すことで増殖する。この増殖性を向上させることで、細胞を用いた研究や医療に大きく貢献できる。前項で取り上げた低出力超音波パルスを、生体外で培養した細胞に対して照射することで増殖性が向上することが、複数種類の細胞に関して報告されている^{109,112,113}。接着性細胞および浮遊性細胞に対して、Figure 1-19に示すように超音波を照射した状態で培養を行なった際に増殖性が優位に向上した。しかし、増殖性向上の詳細なメカニズムは不明である。

1.5.3 細胞分化の制御

細胞はその種類の応じて様々な機能を有し、それぞれの器官を形成している。しかし、こういった細胞は元からその機能を有しているわけではなく、Figure 1-20 に示すように幹細胞と呼ばれる無限に増殖する細胞が徐々に分化することで特有の機能を体得する¹¹⁴。この分化には、細胞周囲の環境が強く影響を与えることが報告されている。近年では、とくに周囲の力学的な環境が分化に与える影響が注目されており、細胞に対して振動を照射して培養することで分化を制御することができることも報告された¹¹⁵。例えば、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 に対して超音波を照射することで筋繊維への分化が促進される^{116,117}。または、超音波の照射によって、分化する細胞種を制御できることも報告された¹¹⁸。さらに、間葉系幹細胞 (Mesenchymal stem cell: MSC) に対して振動を照射することで、分化する細胞種を制御できることも明らかになってきた^{119,120}。

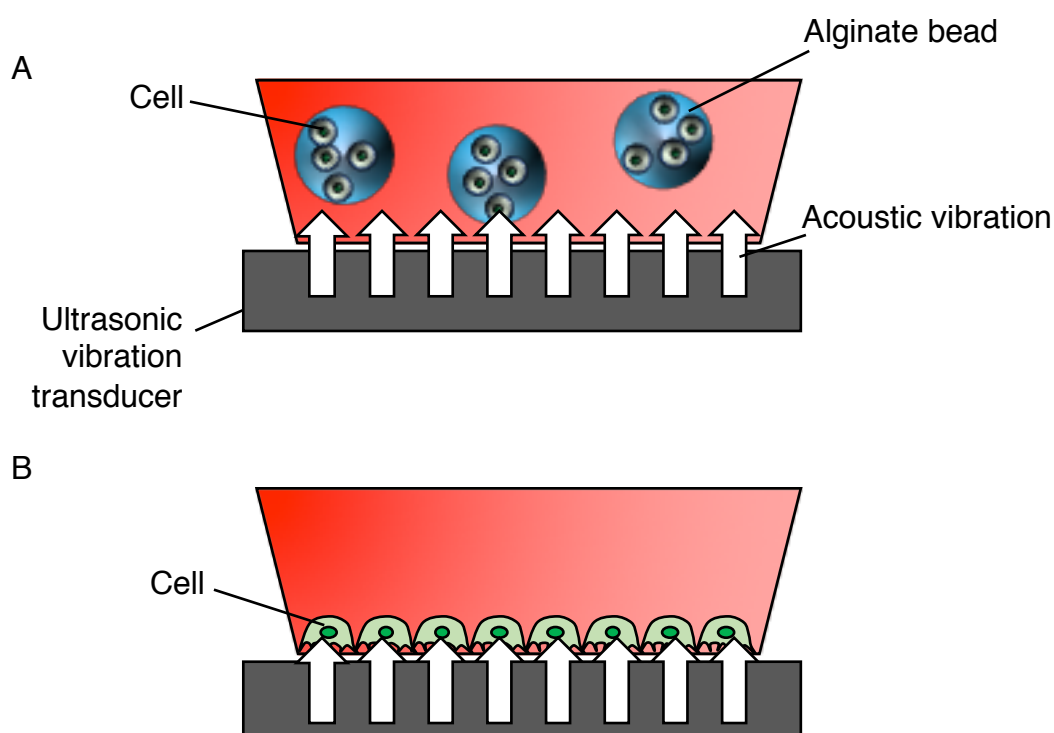


Figure 1-19. Schematic image of ultrasonic irradiation to suspended (A) and adhered (B) cells

1.5.4 細胞遊走の促進

接着性細胞が他の物体に接着した状態で生存することはすでに述べた。これに加えて、細胞は生体内および生体外で自ら移動することが知られている。この移動は遊走と呼ばれている。遊走のメカニズムを Figure 1-21 (A) に示す。同図に示したように、細胞は培養面に対して、より正確に言えば培養面に接着した細胞外マトリクスに対して、複数の接着タンパク質を介して接着している。遊走の際は、その一部を剥離させ、細胞質の一部を進展させた後に、新たに接着点（半接着班）を構成する⁴²。これを繰り返すことで細胞は遊走を行う。また、通常は細胞は単体ではなく複数の状態で存在し、その場合の遊走は集団遊走 (Collective migration) と呼ばれている。この際は Figure 1-21 (B) に示すように、集団の先頭の細胞がリーダーとなって、他のフォロワーと呼ばれる細胞を牽引する⁵⁰。

上記に示した細胞の遊走は、細胞の増殖や分化、さらには創傷治癒やがん治療などに大きく関わるため、遊走を制御する研究が盛んに行われている。その中の取り組みとして、超音波を用いたものが報告されている。Figure 1-22 に示すように、表面弾性波を発生させる振動

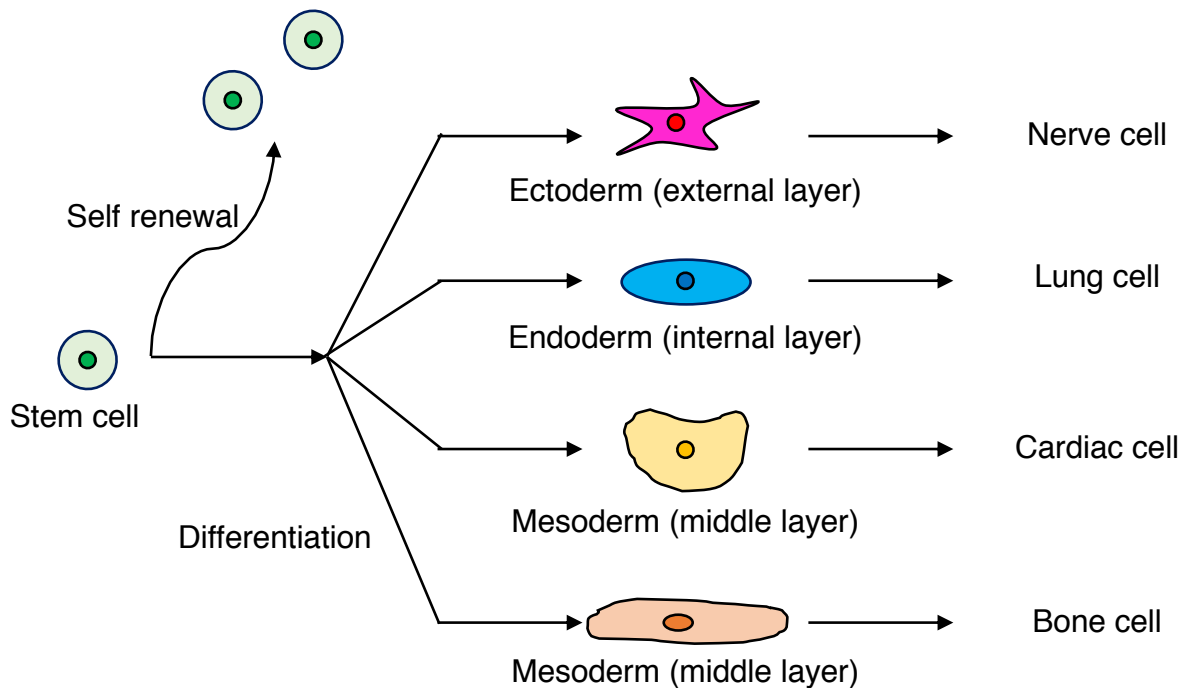


Figure 1-20. Cell differentiation

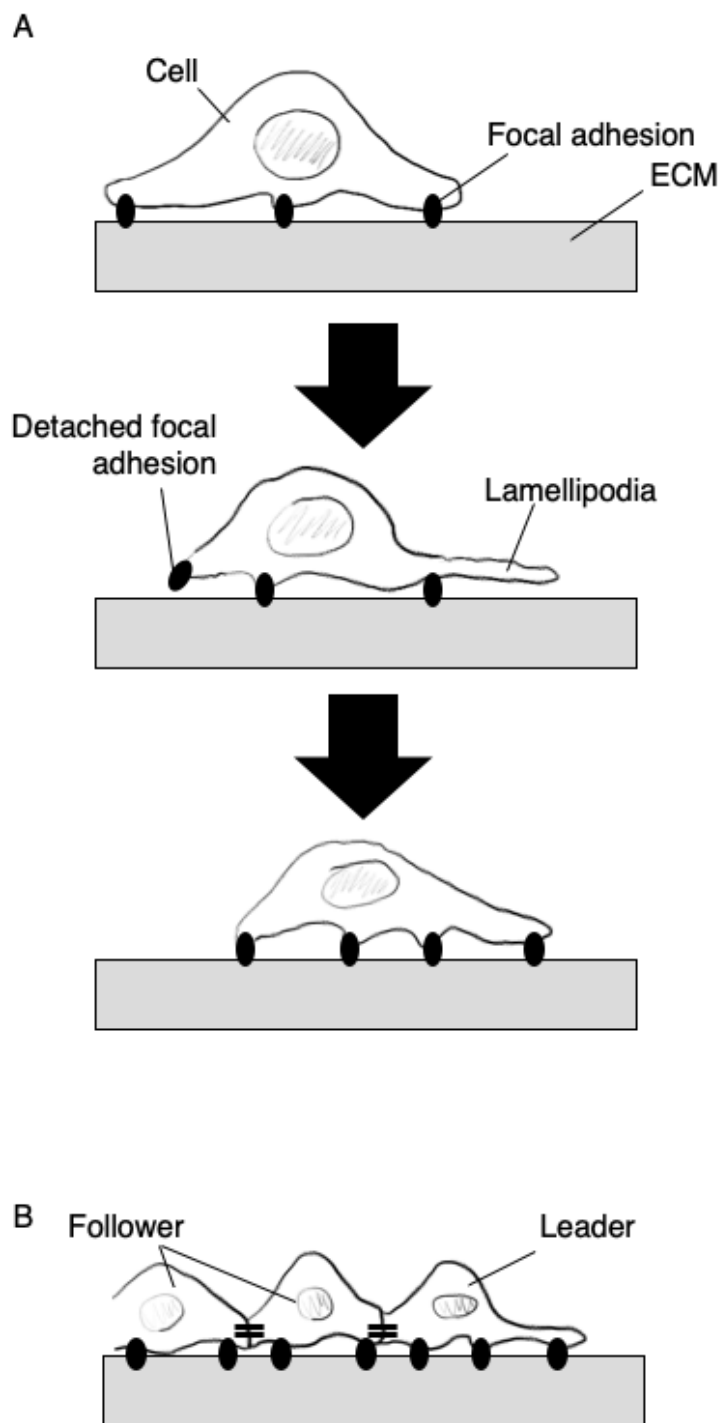


Figure 1-21. Mechanism of cell migration. (A) single cell migration (B) collective cell migration

子 (Surface Acoustic Wave Device: SAW Device) 上に細胞を播種し, 人工的に傷を模したモデル (Wound healing model) を作る¹²¹. 継時観察を行いつつ, 傷がふさがり面積を定量する Wound healing assay が一般的な遊走の定量化手法である. このデバイスによって細胞に超音波を照射して培養することで, 細胞の遊走が促進されることが報告されている. このように遊走を促進することによって, 創傷治癒などに応用できる.

1.5.5 遺伝子導入への応用

近年のバイオエンジニアリング分野の応用技術の1つとして, 遺伝子工学がある. 遺伝子工学とは, 人工的に遺伝子を操作する技術を指す. この基礎技術として, 特定の遺伝子を細胞に導入する, 遺伝子導入という段階がある. 遺伝子導入には様々な手法が報告されており, 生物学的手法や化学的手法, 物理的手法がある. それぞれの特徴を Table 1-2 に示す.

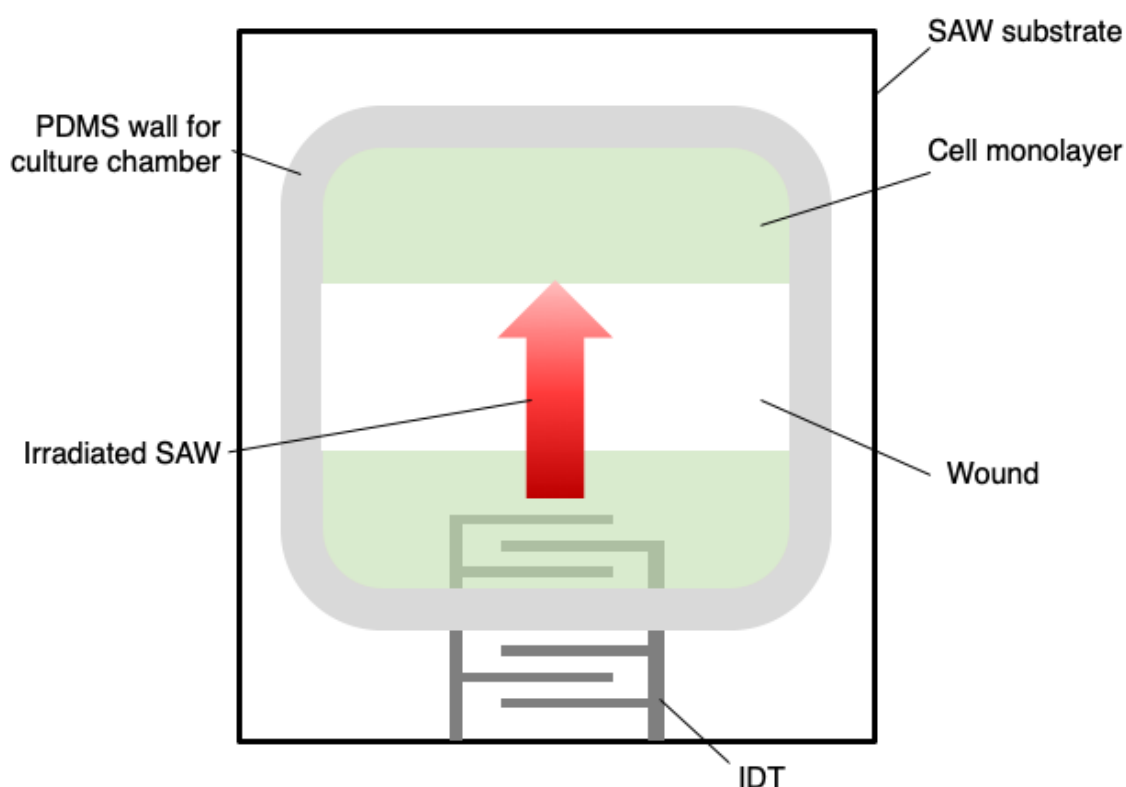


Figure 1-22. Wound healing assay using ultrasonic irradiation *in vitro*

生物学的な手法としては、ウイルスベクターが用いられる。Figure 1-23 に示すように、本手法では細胞に導入したい遺伝子をウイルスの持つ遺伝子の一部に挿入して、そのウイルスを通じて細胞内に取り込ませる¹²²。この手法では、簡便で効率的に遺伝子導入が行える一方、ウイルスによる汚染や免疫反応による不活性化などのリスクがある。

化学的手法としては、陽イオン性リポソームを用いたリポフェクション法や陽イオン性ポリマーを用いた方法など、トランスフェクション試薬を用いた手法が多数開発されている¹²³。細胞の核は負電荷に帯電しているため、陽イオン性の物質に遺伝子を結合させることで細胞の核に所望の遺伝子を導入する。こういった手法では、市販品を用いて簡便かつ高効率に様々なサイズの遺伝子を導入できるが、化学毒性に加えて、細胞の種類や状態に応じて導入効率変動することが指摘されている。

最後に、物理的な手法として、超音波を利用したソノポレーションなどが報告されている (Figure 1-24)。これは、超音波を用いて発生させたキャビテーションによって細胞に小さな

Table. 1-2 Features of each method of transfection

Classification	Method	Pros	Cons
Biological	Virus vector	High frequency, Easiness	Risk of contamination, Deactivation by immunity
Chemical	Cyclodextrin, Polymers, Liposomes, Nanoparticles	High frequency, Easiness, Abundant commercial item	Chemical toxicity, Variation of transfection efficiency depending on condition
Physical	Electroporation, Micro injection, Laser irradiation, Sonoporation	Simple principle, Selectable of targets, Requiring no vector, No limit of the size of transfection	Requiring special device and training, Nucleic acid subject to damage

穴を開けることでそこから遺伝子を導入する^{124,125}。この手法は、特殊な装置や技術が必要であるが、化学毒性や汚染のリスクもなく、自由な大きさの遺伝子を適所に導入できるというメリットがある。

1.6 研究目的

本章では、細胞を用いた医療の現状と課題、これらを解決するための取り組みについて述

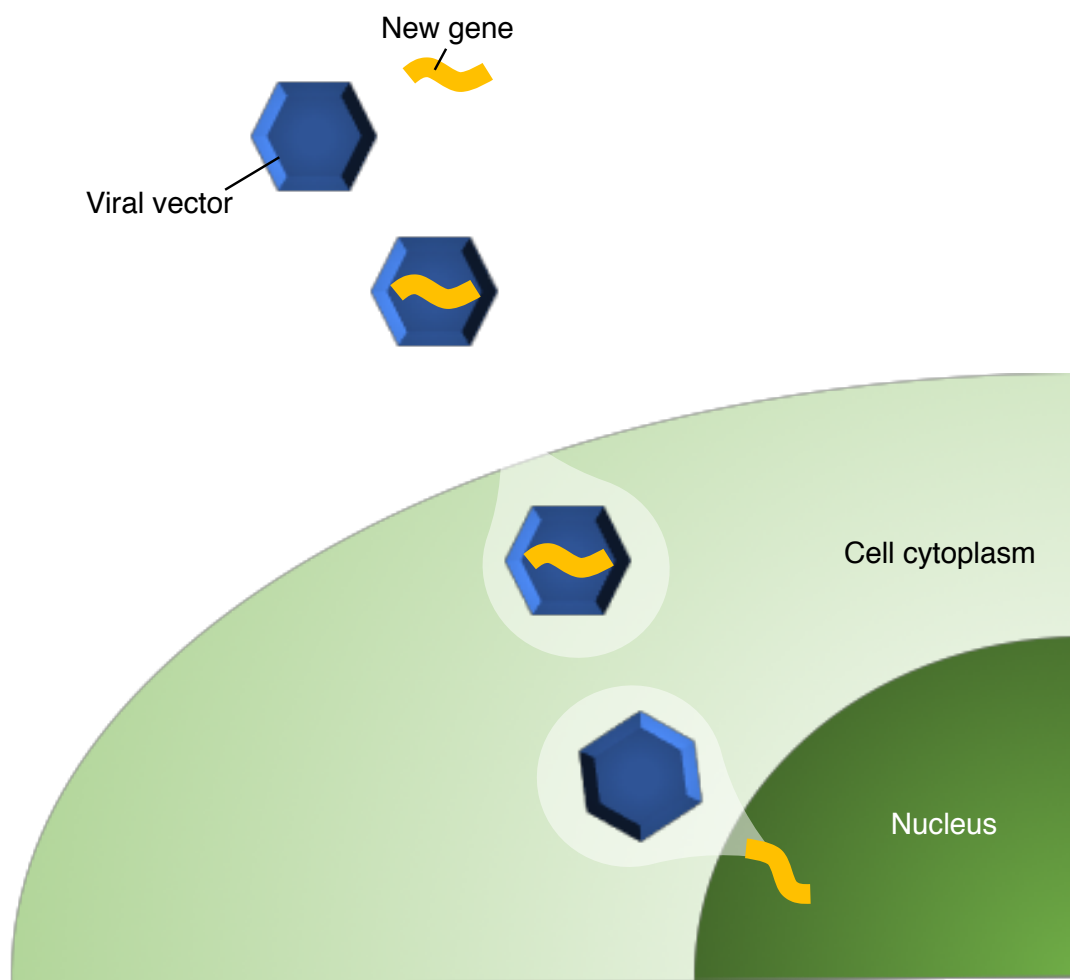


Figure 1-23. Gene transfection using viral vectors

べた。1.1 節では、細胞を用いた種々の医療について述べた。1.2 節では、細胞培養プロセスの概要を示し、培養中の細胞の位置を制御すること、および培養した細胞をシート状に回収する手法の確立が課題であることを指摘した。1.3 節では、培養中の細胞の位置を制御する手法の先行研究とその問題点を述べた。1.4 節では、培養した細胞をシート状に回収する先行研究とその問題点について述べた。これらの先行研究から、超音波を用いることで現状の課題をブレイクスルーする可能性を指摘し、1.5 節では超音波のバイオテクノロジー分野への応用例について述べることで、現状における超音波とバイオテクノロジーとの親和性について示した。

以上のことから、細胞のパターニング、および細胞シートの回収に対して、汎用的な細胞培養容器に適用できる超音波を用いたマニピュレーション手法を確立することで、細胞培養プロセスにおける現状の課題を解決し、細胞を用いた医療に対するブレイクスルーになると考えられる。このため、本研究の目的を、超音波を用いて接着性細胞のパターニングを行う手法、および培養した接着性細胞をシート状に回収する手法を確立することとする。本目的を達成するために、まず、培養面上の細胞を kHz 帯の超音波によってパターニングする手法を確立する (2 章)。つぎに、実際に医療現場やバイオエンジニアリングに関する研究を行う場合に用いられる汎用的な細胞培養ディッシュにおいて、超音波による細胞のパターニングを実行する手法を確立し、パターニングした細胞を長期培養することで、超音波が細胞に与える影響を確認する (3 章)。さらに、汎用的な培養容器で培養した細胞を、超音波によってシート状に回収する手法を実現し、回収した細胞シートの機能性を詳細に確認する (4 章)。以上の研究から得られた知見をまとめ、5 章に結論を示す。

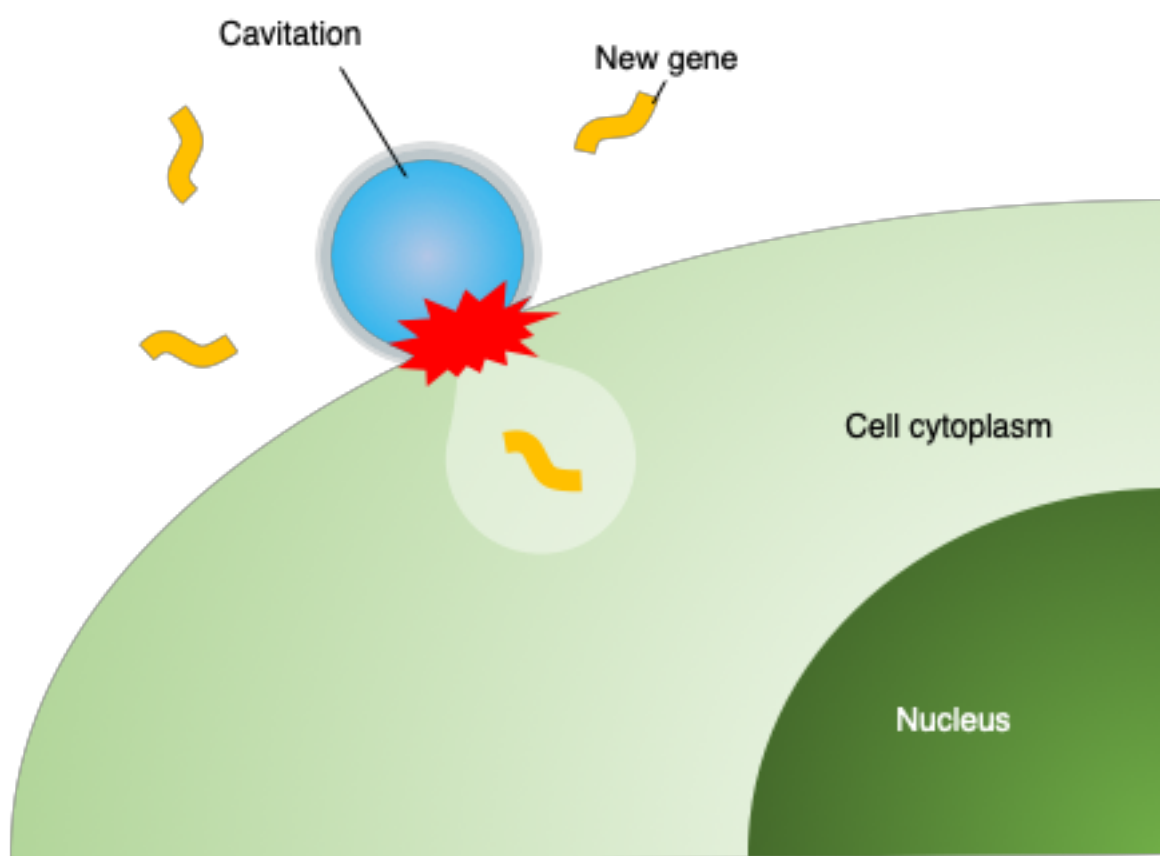


Figure 1-24. Schematic image of sonoporation

培養基材に励振した固有振動モードを用いた細胞パターンニング

1 章で述べたように、本研究では超音波振動を用いて培養面全体の細胞をパターンニングする方法および培養したコンフルエントな細胞をシート状に剥離する方法を提案する。本章では、細胞のパターンニングに関して、提案するコンセプトの妥当性を検証する。

2.1 コンセプト

1.3 節で述べたように、一般的には細胞パターンニングを行う際には、細胞培養面の表面改質や化学物質等を用いることが一般的である。しかし、こういった方法では使用した物質が細胞に影響を与える懸念がある。本章では培養面の固有振動を用いることで細胞のパターンニングを達成する。

超音波振動による細胞のパターンニングについては 1.3.4 項で述べた。この先行研究では、MHz 帯の高周波振動を用いていた。機械振動の振動速度の吸収減衰は

$$V = V_0 e^{-\alpha x} \quad (2.1)$$

のように示される。ここで、 V は振動速度、 V_0 は最大振動速度、 α は振動数の 2 乗に比例する減衰係数、 x は振動の伝播距離である。すなわち、振動速度の減衰は機械振動の振動数に大きく影響される。このため、MHz 帯などの高周波数帯の機械振動を用いた細胞パターンニングでは粘性減衰による媒質温度の上昇が懸念される¹²⁵。一方で、細胞をパターンニングするための音響放射圧 F は

$$F = 2\pi\rho_0(kR_0)^6 \frac{1}{(1+2\lambda)^2} \left[\left(\lambda - \frac{1+2\lambda}{3\lambda\sigma} \right)^2 + \frac{2}{9}(1-\lambda)^2 \right] \quad (2.2)$$

のように示される¹²⁶。ここで、 ρ_0 は媒質の平衡密度、 k は波数、 R_0 は細胞の半径、 $\lambda = \rho_0 / \tilde{\rho}_0$ で $\tilde{\rho}_0$ は細胞の密度である。すなわち、細胞をパターンニングする力を生み出す音響放射圧は振動数と振幅に依存する。この事実は、熱を発生させるリスクが低い低周波の振動を用いる際には、より大きな振幅を有する振動を用いる必要があることを示唆している。さらに、従来の手法では直線状もしくは点状の細胞パターンニングを限定的な領域で行うことが限界であった。

そこで本章の研究では、細胞培養面に kHz 帯の大振幅を有する固有振動を励振することを着想した。固有振動について説明する。弾性体に対して、周期的に外力を発生させることによって、その弾性体に振動が発生する。振動する物体には寸法や物性値などから決まる固有振動数があり、固有振動数に応じて周期的に外力を発生させることにより、物体は共振して固有振動モードが励振される。固有振動モードを励振された物体には Figure 2-1 に示すよう

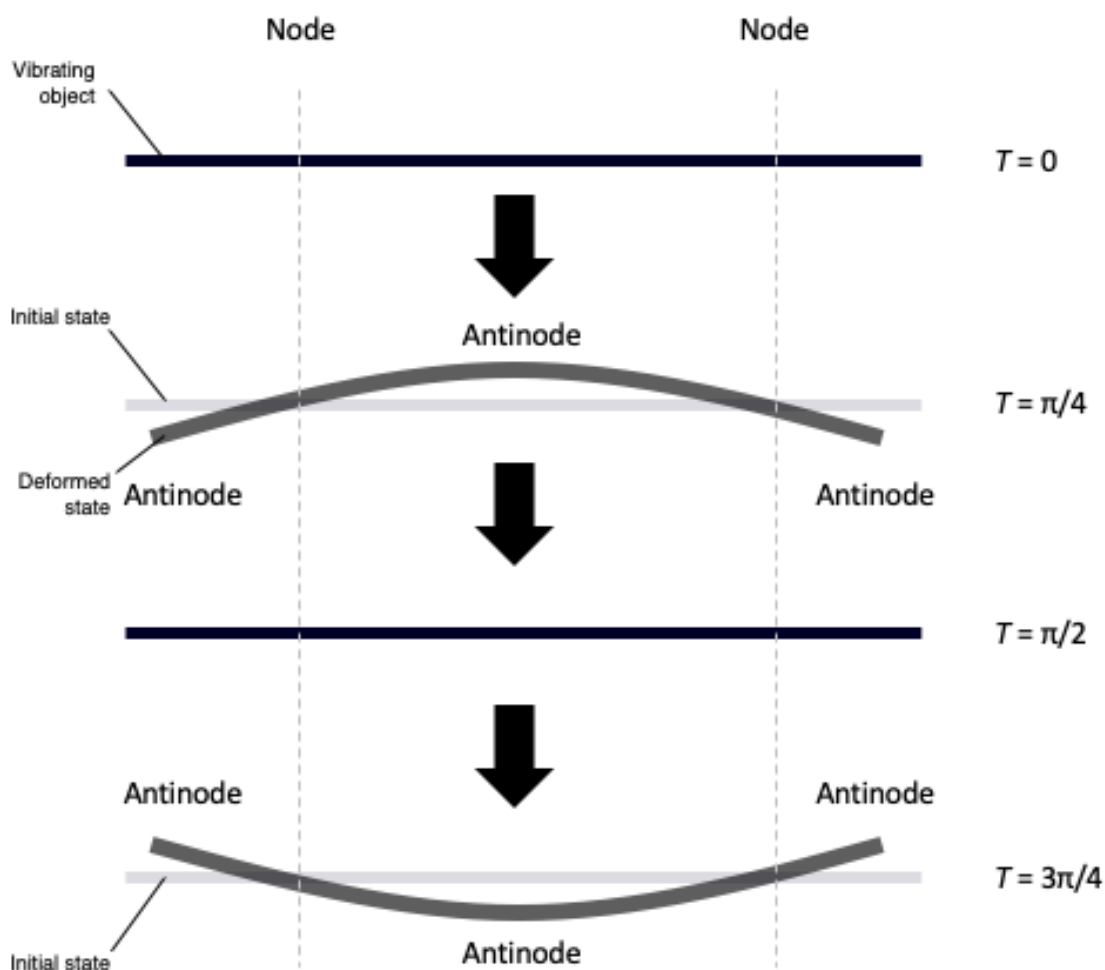


Figure 2-1. Conceptual diagram of resonance vibration

に振幅が最も大きい部分（振動の腹）と振動しない部分（振動の節）がある¹²⁷。そこで、細胞を播種した培養面に対して、この固有振動を励振することで細胞を振動の節にパターンニングすることが可能であると着想した。この節の形状は励振する固有振動モードによって異なる。固有振動モードは振動する物体の自由度に依存しており、実際の物体は無限自由度を有するため、固有振動モードは無限に存在する。このように培養面の固有振動モードを用いて細胞をパターンニングすることで、熱の発生を抑制しつつ、培養面全体において、先行研究と比較して自由度の高い形状に細胞をパターンニングできる。

接着性細胞は播種すると一定時間をかけて培養面に接着する。培養面に振幅の分布を持つ固有振動を励振した状態で細胞を播種すると、その振幅に応じて式(2.2)で示した音響放射圧が発生する。すなわち、振動の腹近傍にいる細胞への音響放射圧が高く、振動の節では音響放射圧が小さくなる。細胞の密度や音速は細胞周囲の培地と異なるため、この影響で、細胞を播種した際に、振動の腹近傍の細胞は接着が阻害され、節に集積して培養面に接着すると思われる。この様子を Figure 2-2 に模式的に示す。同図のように、培養面の固有振動モードを用いることで細胞を固有振動モードの節の位置にパターンニングできる。すなわち、所望の細胞パターンの形状に応じた節を形成すれば簡単に細胞をパターンニングすることが可能となると考えられる。たとえば、円形の培養面上で細胞をパターンニングする場合、代表的な節円モードを励振すれば、Figure 2-3 に示すように細胞は節円上にパターンニングされると推測できる。

本研究では、提案する細胞パターンニングのコンセプトを確認するために、汎用的な培養ディッシュの形状に近い円板状の薄板の固有振動モードを利用することとした。以上のコンセプトから細胞パターンニングの知見を得るために、細胞を培養する培養面の設計および製作、細胞パターンニングデバイス全体の設計および製作、細胞を用いたパターンニング実験を行った。

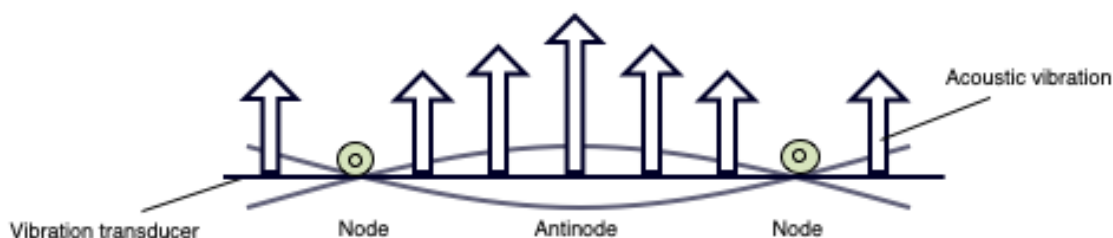


Figure 2-2. Schematic image of cell patterning by using resonance vibration of cell culture substrate

2.2 培養基材の製作

本節では、培養基材の製作を行う。なお、これ以降、細胞を培養する培養面と振動を励振する圧電素子とを接着することで構成される部品を培養基材と呼称する。

2.2.1 培養面の設計

本項では細胞培養面として用いる材質の決定と形状の決定を行う。培養面には、効率的に

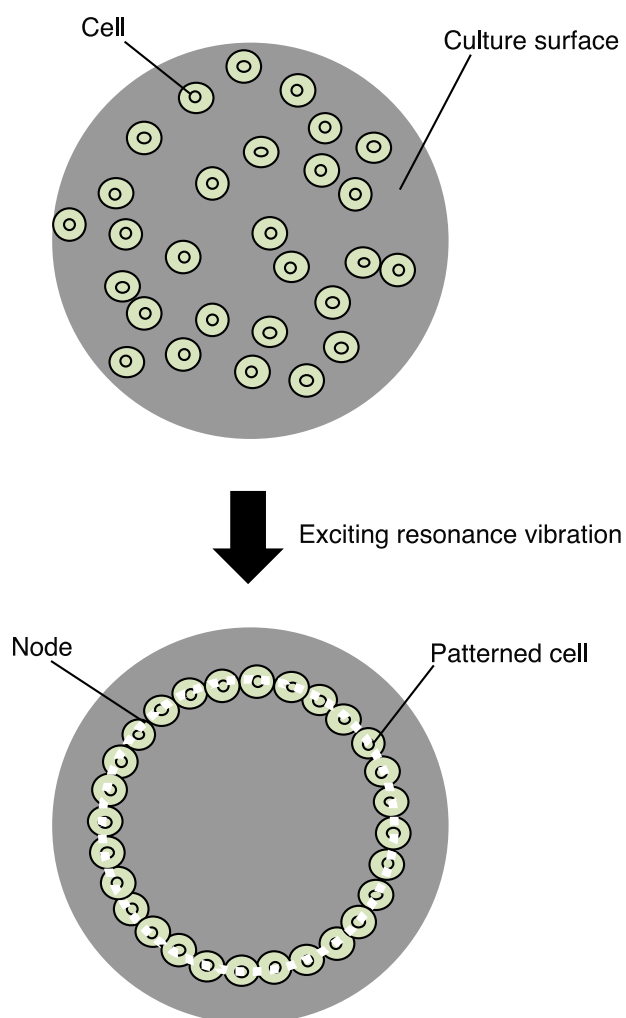


Figure 2-3. Schematic image of cell patterning by using resonance vibration having single nodal circle

振動を励振できることに加えて、細胞に対する生体適合性の高さが求められる。振動を効率的に励振するためには、機械的 Q 値 (Quality factor) の高い材質が必要である。機械的 Q 値とは、

$$Q = \frac{\omega_0}{\omega_1 - \omega_2} \quad (2.3)$$

と定義される無次元数である¹²⁸。ここで、 ω_0 、 ω_1 、 ω_2 はそれぞれ、共振ピークにおける共振周波数、共振周波数から見て低周波数側、高周波数側において振動エネルギーが共振時の半分となる周波数である。一般的に機械的 Q 値の高い材質としては金属材料が報告されている。そこで、金属材料の中でも加工性に優れ、生体適合性が高い、ステンレス鋼 (SUS316L) を用いることとした¹²⁹。なお、Table 2-1 と Table 2-2 に SUS316L の化学成分と物性値を示す。SUS316L は、SUS304 のニッケル (Ni) 含有量高め、モリブデン (Mo) を添加し、炭素 (C) の含有量を少なくした金属であり、耐食性が高く医療用にも多く用いられているステンレス鋼である。

本研究では、培養面を直径 40 mm、厚さ 1 mm の円形の SUS316L 円板とし、固有値解析によって固有振動モードの形状と固有振動数を確認した。固有振動モードの形状は、細胞培養面に用いる SUS316 の形状や寸法、励振する固有振動モードは有限要素法による固有値解析を用いて確認した。なお、固有値解析には有限要素法解析ソフト ANSYS Ver 15.0 を用いた。固有値解析を行った際には Table 2-2 に示した SUS316L の物性値を用い、シリコンゴムで培養面を把持することを鑑みて (後述) 境界条件は自由端とし、要素形状は正四面体、要素数は 84768 とした。この条件において振動振幅の計算値は 0.1%以下に収束しているため、妥当な条件と考えている。本解析の結果、比較的低次の固有振動モードである、円形状の節を有する固有振動モードおよび円と十字を合わせた形状の節を有する固有振動モードを用いて提案する細胞パターンニングのコンセプトを検討することとした。Figure 2-4 に、固有値解析により求めた固有振動モードの形状を示す。図中のカラーバーは各固有振動モード

Table 2-1 chemical composition of SUS 316L

C	Si	Mn	P	S	Ni	Cr	Mo	Fe
0.018	0.28	1.25	0.037	0.023	12	16.25	2	Bal.

Table 2-2 Physical property of SUS 316L

Density, kg/m ³	Young's modulus, N/m ²	Poisson's ratio
7.98 × 10 ⁶	19.3 × 10 ¹⁰	0.3

における最大振幅で正規化した相対振幅を示している。同図より、この SUS316L 円板のそれぞれの節の形状を有する固有振動モードの固有振動数は、それぞれ 7.1 kHz および 26.9 kHz であることがわかる。

さらに、接着性細胞を培養するためには、培養面への細胞の接着性が汎用性の細胞培養ディッシュやフラスコと同等である必要がある。金属表面での細胞培養では表面粗さが培養効率に影響することが報告されているため、微粒子ピーニング (Fine Particle Peening: FPP) 処理により適切な表面粗さになるよう表面処理を施すこととした。Table 2-3 に FPP 処理の条件を

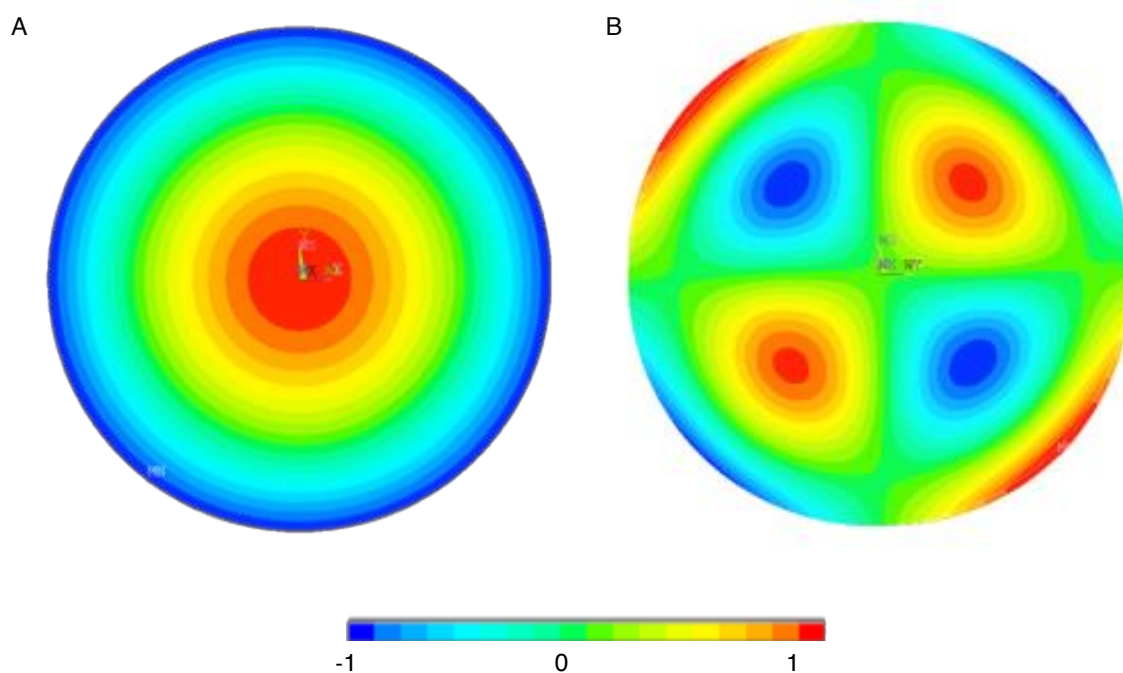


Figure 2-4. Eigenvalue analysis (ANSYS 15.0). Colored bar indicates out-of-plane displacement normalized to the maximum amplitude. A: Resonance vibration having single nodal circle (vibration frequency, 7.1 kHz). B: Resonance vibration having cross-circle nodal pattern (vibration frequency, 26.9 kHz).

Table 2-3 Condition of fine particle peening

Projection pressure, MPa	0.6
Projection duration, s	30
Projection distance, mm	100
Particles	Al ₂ O ₃
Particle supply amount, g/s	1.0

示す。なお、これらの条件は金属培養面における細胞の増殖性を検討した先行研究を参考に決定した⁴³。

2.2.2 圧電素子の設計

本研究では、培養面に固有振動数に応じた外力を付与するために圧電素子を用いる。圧電素子は超音波モータなどの固有振動を用いたアクチュエータに広く応用されている。励振する固有振動モードの腹の近傍において、圧電素子を用いて固有振動数に対応した周期的なひずみを発生させることによって、効率的に所望の固有振動モードを励振できる。そこで、培養面に対して効率的に上記の固有振動モードを励振するためには、圧電素子の寸法および圧電素子表面に配置する電極パターンを適切に設計および製作する必要がある。円板に本研究で用いる固有振動モードを効率的に励振するためには、Figure 2-4 に示した各固有振動モードにおいてひずみの大きい部分、すなわち、面外振幅が大きい部分に圧電素子を接着し、素子への電圧印加によってひずみを発生させることが有効である。このため、Figure 2-5 のように、厚さ方向に分極された圧電素子円板の両面に電極を配置し、片側の電極を十字状に分割することを考えた。これを培養面として用いる SUS316L 円板の細胞培養表面に対して反対の面に接着し、厚さ方向に周期的な交流電圧を印加することで、所望の固有振動モードを効率的に励振することが可能である。この圧電素子および電極パターンの妥当性を検討するために、培養基材の境界条件を自由端とし、要素形状は正四面体として有限要素法による圧電-構造連成解析を行った。圧電-構造連成解析に用いた各部品の物性値および寸法を Table 2-4~2-8 に示す。圧電素子の各電極に印加する交流電圧の入力周波数、および各電極への印加電圧の位相差を変化させ、励振される固有振動モードを確認した。なお、入力電圧は 10 V とし、解析には有限要素解析ソフト ANSYS Ver 15.0 を用いた。Figure 2-5 の電極配置において、各電極に同位相の電圧を印加したシリーズ I と、電極 A と D を同位相、これに対して電極 B と C を逆位相に加振したシリーズ II に対して解析を実行した。各シリーズの説明は Figure 2-6 に記述した。解析結果を Figure 2-7 に示す。同図より、シリーズ I に周波数 7.7 kHz の交流電圧を入力すると円型の節を持つ固有振動モードが励振されることが、シリーズ II に周波数を 27.6 kHz の交流電圧を入力すると円型および十字型の節を合わせ持つ固有振動モード励振されることがわかる。Figure 2-7 の振幅分布は Figure 2-4 と十分類似していることから、設計した圧電素子および電極パターンによって所望の固有振動モードを励振可能と結論づけた。以上の検討結果に基づき圧電素子および電極パターンの詳細を Figure 2-5 のように決定した。なお、電極パターンの一部に設置したグランド相は SUS316L 円板側の電極をグランドに接続するためのものであり、Figure 2-5 に示した折り返し電極を用いて圧電素子の振動基材に接着する側の電極と通電している。一方、同じく電極パターンの一部にあるセンサ相は独立した電極

Table 2-4 Physical property of materials

	SUS316L	Piezoelectric substrate	Adhesion layer
Density, kg/m ³	7.98×10^6	7.80×10^3	2.30×10^4
Young's modulus, N/m ²	19.3×10^{10}	8.20×10^{10}	2.50×10^9
Poisson's ratio	0.3	0.29	0.40

Table 2-5 Piezoelectric substrate's dielectric matrix

Direction	Value, F/m
e_{11}	3.50×10^{-9}
e_{22}	3.50×10^{-9}
e_{33}	3.56×10^{-9}

Table 2-6 Piezoelectric substrate's anisotropic elastic matrix

	X, N/m ²	Y, N/m ²	Z, N/m ²	XY, N/m ²	YZ, N/m ²	ZX, N/m ²
X	10.35×10^{10}	5.09×10^{10}	5.09×10^{10}	0	0	0
Y	5.09×10^{10}	10.35×10^{10}	5.09×10^{10}	0	0	0
Z	5.09×10^{10}	5.09×10^{10}	10.35×10^{10}	0	0	0
XY	0	0	0	2.63×10^{10}	0	0
YZ	0	0	0	0	2.63×10^{10}	0
ZX	0	0	0	0	0	2.63×10^{10}

Table 2-7 Piezoelectric substrate's piezoelectric matrix

	X, C/m ²	Y, C/m ²	Z, C/m ²
X	0	0	-9.297
Y	0	0	-9.297
Z	0	0	28.681
XY	0	0	0
YZ	0	17.632	0
ZX	17.632	0	0

Table 2-8 Dimension of culture substrate

	SUS316L plate	Piezoelectric substrate	Adhesion layer
Diameter, mm	40	30	30
Thickness, mm	1	0.5	0.001

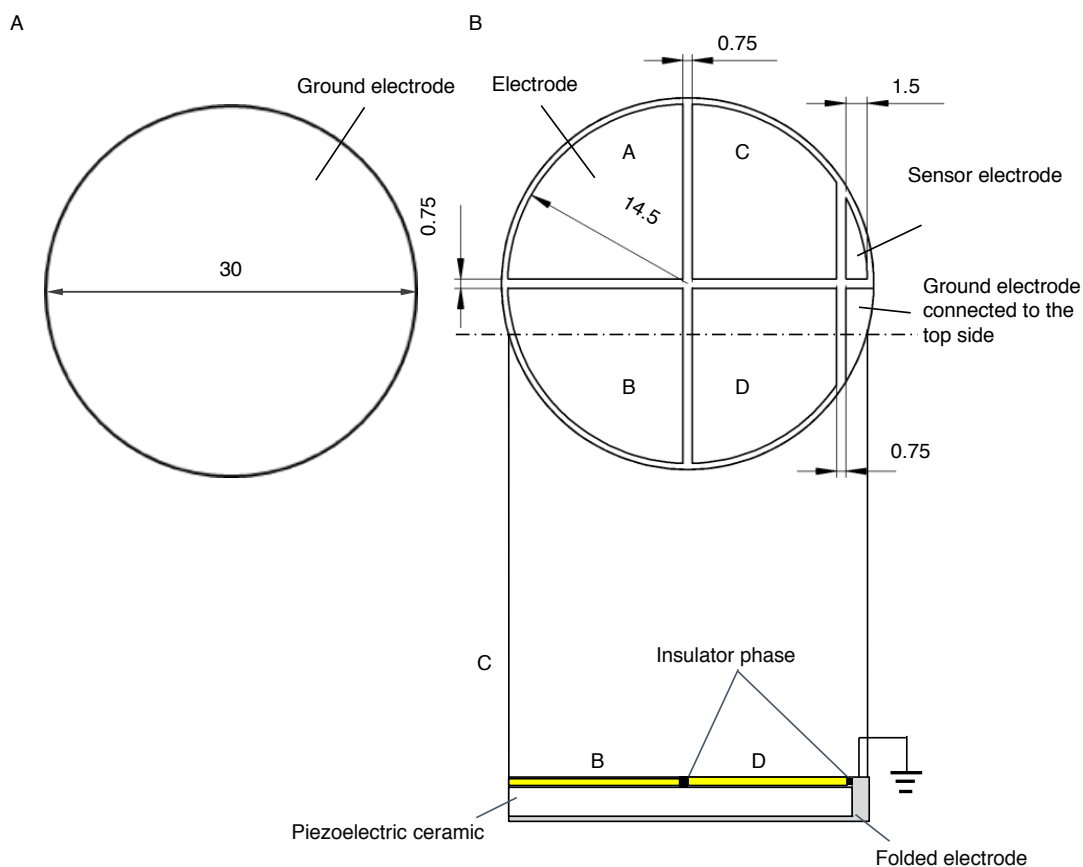


Figure 2-5. Design of the piezo electric substrate. Polarization is along the thickness direction. (A) Top face on which the cultivation substrate was glued. (B) Bottom face. (C) Side view. Unit: mm.

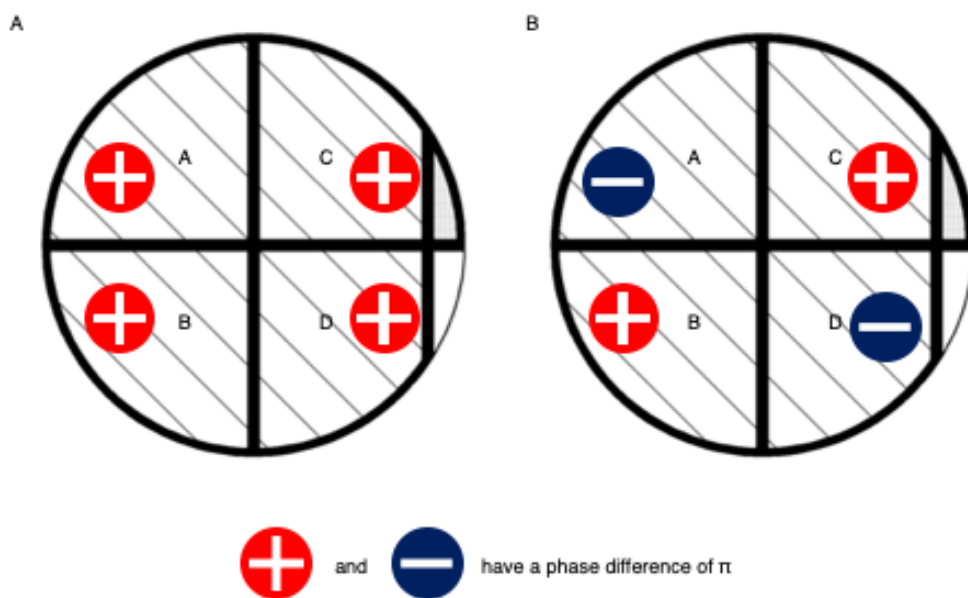


Figure 2-6. Method of inputting AC voltage on the piezo electric substrate. (A) series I (B) series II

であり、振動が励振された際に圧電素子のひずみから正圧電効果により電圧が出力される領域として設けられている。すなわち、あらかじめ振動子に励振された固有振動の振動振幅とセンサ相からの出力電圧の関係を明らかにすることにより、振動子の振幅を間接的に測定することができる。各電極間の絶縁相の幅は加工可能な最小の幅である 0.75 mm とし、振動励振用の電極を固有振動モードの腹付近に配置するため、センサ相およびグランド相は振動の節近傍に配置した。

2.2.3 培養面および圧電素子の製作とこれらの接着

効率的な固有振動モードの励振のため、上記のように培養面および圧電素子を設計した。本項では、培養面および圧電素子を製作し、これらを接着し、培養基材を製作する。

上記の設計に基づいて培養面を製作した。SUS316L 円板はワイヤ放電加工により加工し、サンドペーパーと研磨剤 (PiKAL, 日本磨料工業株式会社) を用いて表面を研磨した。鏡面になったことを確認した後に、FPP 処理を施した。圧電素子は株式会社富士セラミックスに製作を依頼して製作した。なお、比較的堅牢で安定した振動の励振が可能である材質の圧電素子 (C-213, 株式会社富士セラミックス) を用いた。製作した圧電素子を Figure 2-8 に示す。

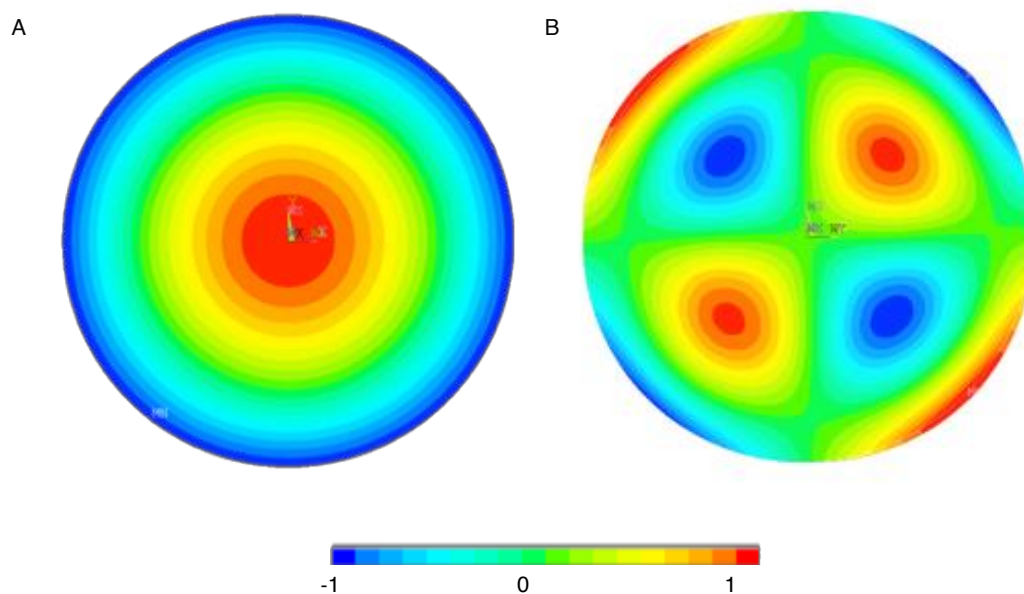


Figure 2-7. Piezoelectric structure coupled analysis(ANSYS 15.0). Colored bar indicates out-of-plane displacement normalized to the maximum amplitude. A: Resonance vibration having single nodal circle (vibration frequency, 7.7 kHz). B: Resonance vibration having cross-circle nodal pattern (vibration frequency, 27.6 kHz).

SUS316L 円板と圧電素子は、2液混合エポキシ系接着剤（クイック 30，コニシボンド）を用いて、加圧接着した。効率的な固有振動モードの励振のため、圧電素子を SUS316L 円板の中心に接着する必要がある。このため、Figure 2-9 に示す接着治具を設計・製作した。なお、接着治具には、構成部品の治具への接着を防止することに加えて、加圧時に全面を均一に加圧することが求められる。このため、非粘着性で弾性率の低いポリアセタールを用いて接着治

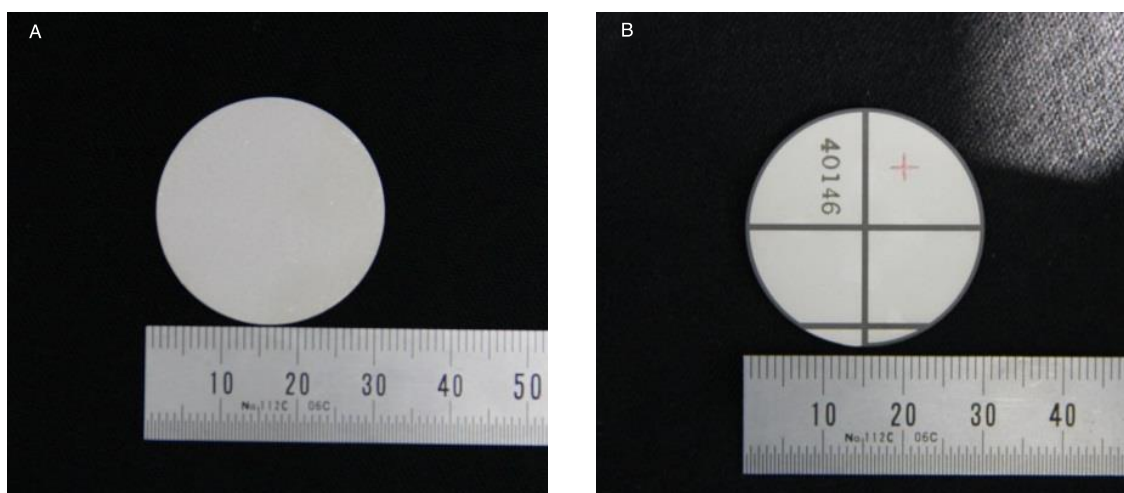


Figure 2-8. Picture of piezo electric substrate (A) Upside (B) Bottom side

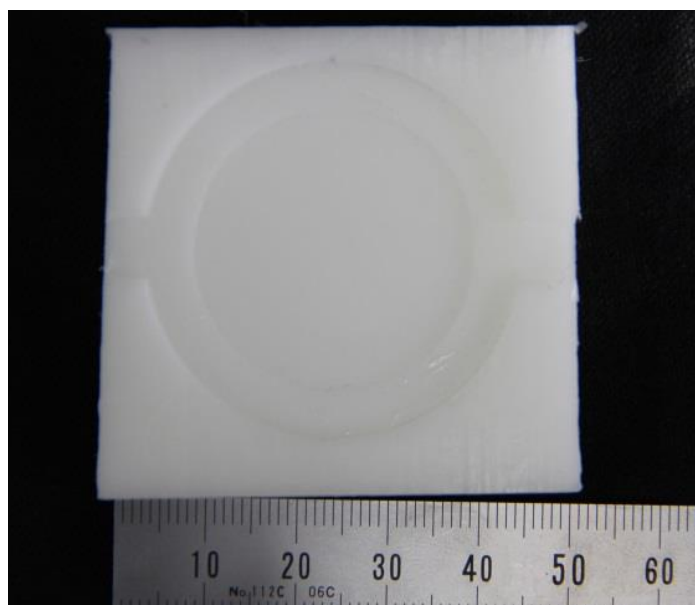


Figure 2-9. Polyacetal jig to align the piezoelectric substrate and SUS316L plate.

具を製作した。なお、接着治具の製作には3次元モデリングマシン (MDX-540A, ローランド D.G 株式会社) を用いた。加圧接着の際は, Figure 2-10 に示すように接着治具に圧電素子, SUS316L 円板の順に挿入し, 上から加圧用カバーで覆った。この際に, 接着剤による振動の減衰を防ぐために, なるべく接着剤の層を薄くするように注意した。その後, Figure 2-11 に示す加圧治具を用いて加圧接着した。加圧条件は, 圧力を 3 N/m^2 , 加圧時間を 8 時間とした。

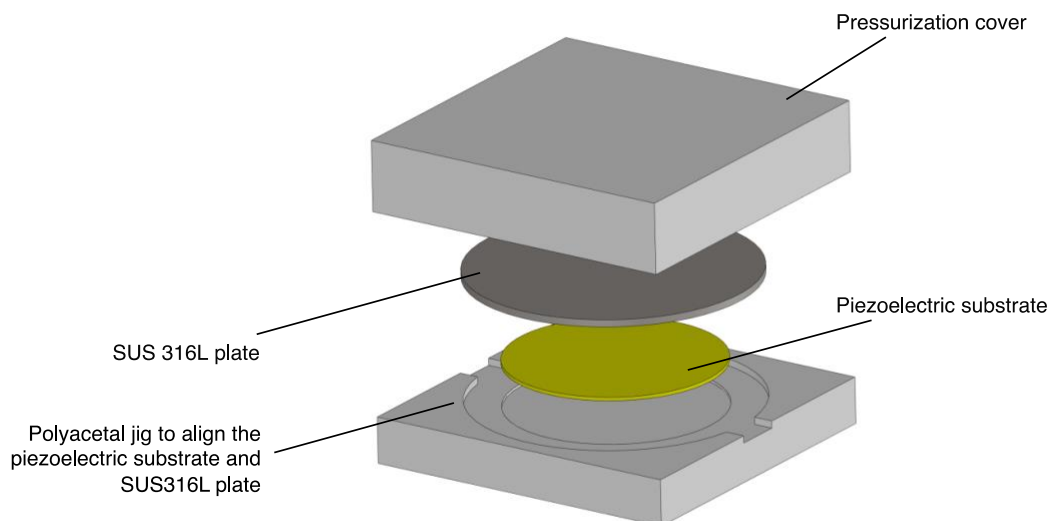


Figure 2-10. Schematic image showing the way to adhere piezoelectric substrate on SUS 316L plate

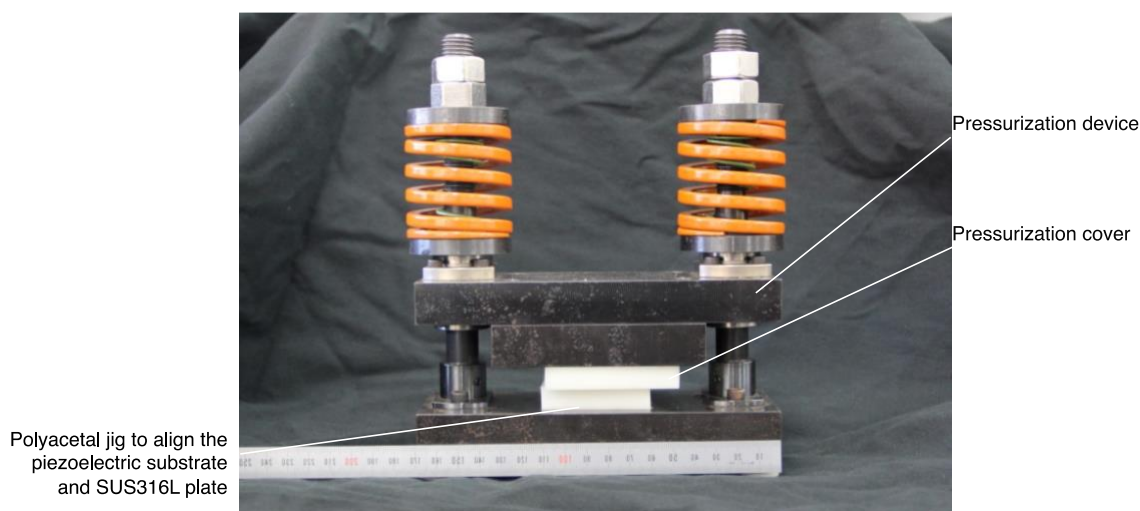


Figure 2-11. Image of pressurization device to adhere piezoelectric substrate on SUS316L plate

加圧接着を行うことで、接着層の厚さを最小限とし、同時に接着剤中の気泡を除去する。こうすることで、超音波振動の吸収減衰と散乱減衰を最小限に止め、熱の発生を抑制し、効率的に固有振動モードを励振可能となる。最後に、交流電圧を印加するため、圧電素子の各電極にリード線をはんだ付けした。製作した培養基材を Figure 2-12 に示す。

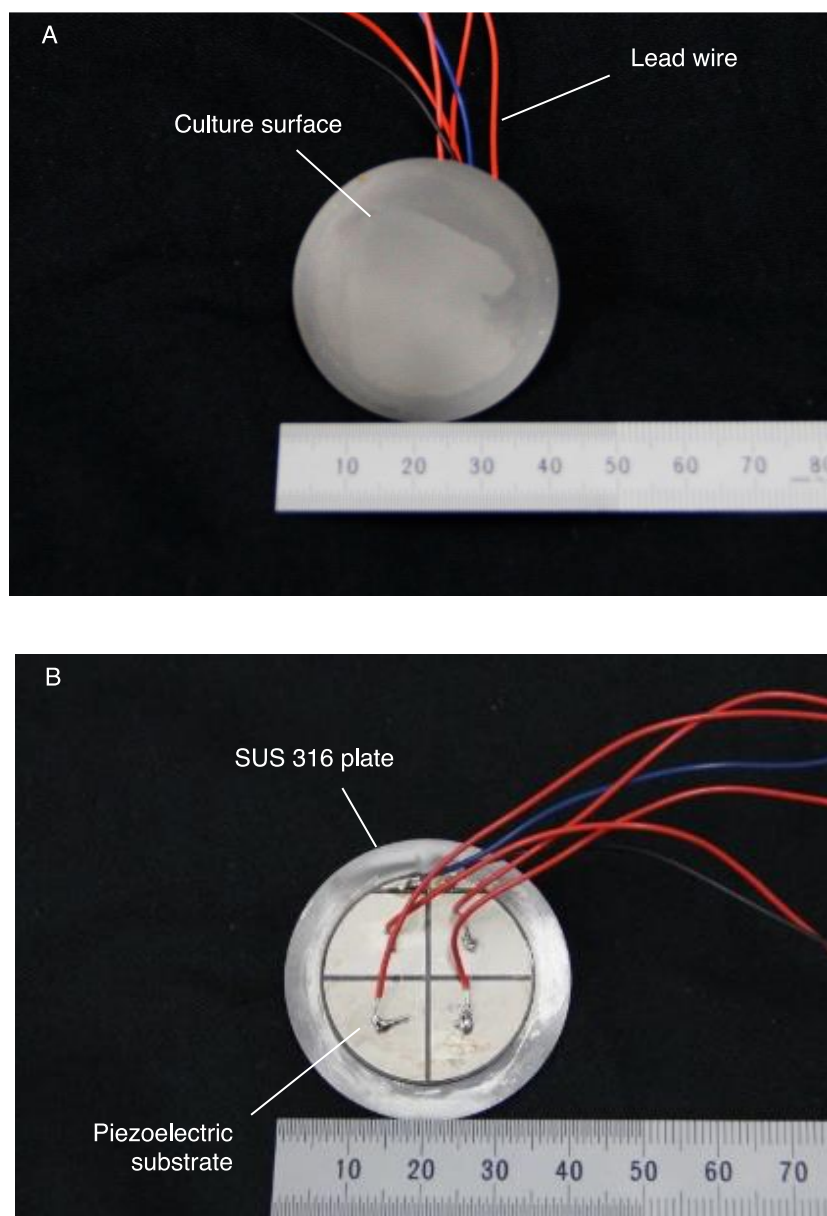


Figure 2-12. Cell culture substrate exciting resonance vibration. (A) Top face on which the cells were cultured. (B) Bottom face.

2.3 細胞パターンニングデバイスの製作

2.3.1 細胞パターンニングデバイスの設計

細胞を培養する際には細胞を培地に浸漬する必要がある。このため、2.2節で設計、製作した培養基材を用いて細胞パターンニングデバイスを製作した。細胞パターンニングデバイスの構造を Figure 2-13 に示す。同図に示すように、本細胞パターンニングデバイスは培養基材、シリコーンゴム部品とアクリル部品から構成されている。シリコーンゴム部品は培養基材を挟み込んで保持することで培地の漏出を防ぐ。なお、ヤング率が十分に小さいシリコーンゴムを用いることで、培養基材の境界条件を自由端に模擬した。アクリル部品はシリコーンゴムベースとシリコーンゴム壁を固定する役割を持つ。これらの部品はねじを用いて固定した。本

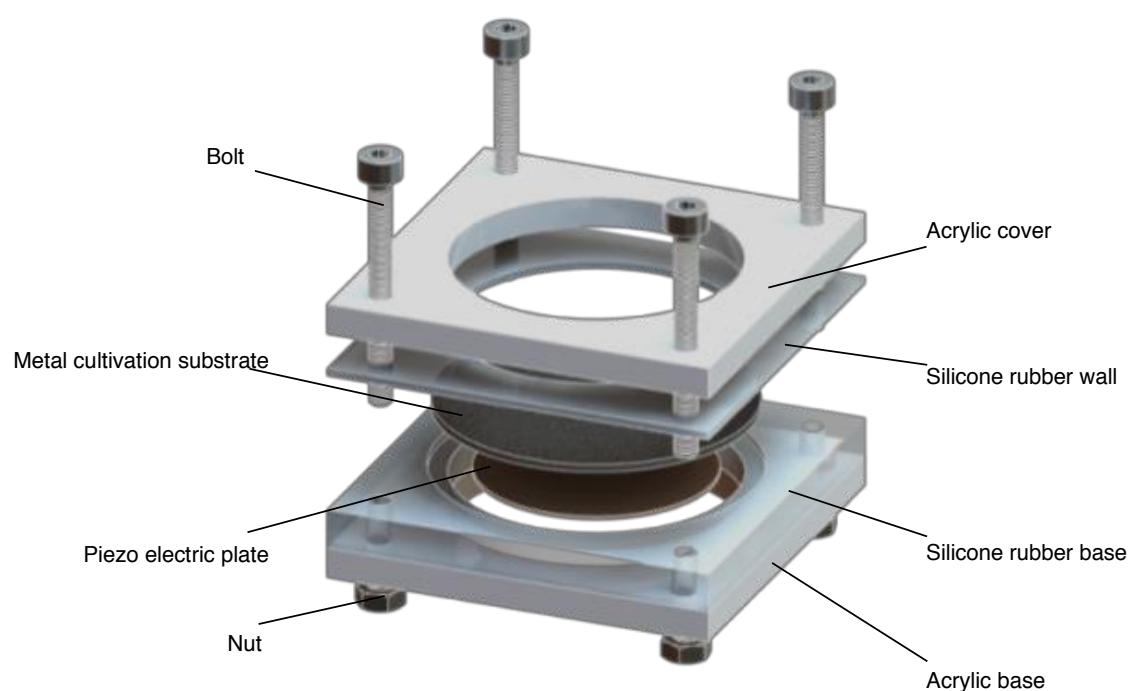


Figure 2-13. Schematic image of the structure of cell patterning device

細胞パターンニングデバイスで細胞を培養する際には細胞パターンニングデバイスを湿度 100% の雰囲気下に長時間置く必要がある。このため、腐食を防止するためにねじは SUS304 ステンレス鋼製とした。なお、シリコーンゴム壁と培養基材から構成される培養容器の直径は 36 mm であり、アクリルカバーの上面から培養面までの深さは 5 mm である。

2.3.2 部品の製作と組み立て

本項では 2.3.1 項で設計した細胞パターンニングデバイスを製作する。アクリル部品は切削加工で製作した。

シリコーン壁とシリコーンゴムベースは、耐熱性に優れたポリエーテルイミド製の鋳型を用いて製作した。なお、この鋳型は切削加工により製作した。硬化前のシリコーンゴム (KE1316, 信越化学工業株式会社) を、10 wt% の硬化剤 (CAT1316, 信越化学工業株式会社) および 20 wt% の希釈剤 (RTV シンナー, 信越化学工業株式会社) と混合し、シリコーンゴム混合液を生成し、これを真空チャンバ (真空デシケーター VL-C 型, アズワン株式会社) 内に配置し、真空ポンプ (ULVAC G-50SA, ULVAC KIKO Inc.) を用いてチャンバ内を減圧して脱泡した。上記の減圧過程を複数回繰り返し、混合液を十分に脱泡した後に、製作した鋳型に流し込み、再度脱泡を行った。十分に脱泡した後に、オーブン (Isotemp Vacuum Oven Model 280A, Fisher Scientific) に配置し、130°C において 30 分焼成した。これらの部品を 2.3.1 項で述べたように組み立てて、細胞パターンニングデバイスを製作した。製作した細胞パターンニングデバイスを Figure 2-14 に示す。

2.4 細胞パターンニングデバイスの振動特性の評価

本節では製作した培養基材を細胞パターンニングデバイスに組み込んだ際の振動特性を測定する。培養基材に振動を励振する際には、圧電素子に交流電圧を印加する。このために、ファンクションジェネレータ (WF1946B, NF Corporation) を用いて発信した交流電圧をアンプ (HSA4051, NF Corporation) によって増幅する。励振された振動の振幅を測定する際は、レーザドップラ振動計 (CLV-3D, PI Polytech) とオシロスコープ (Wave surfer 424, Teledyne LeCroy) を用いて培養面の振動速度を測定し、振幅を計算する。以上の測定方法について Figure 2-15 にイメージ図を示す。

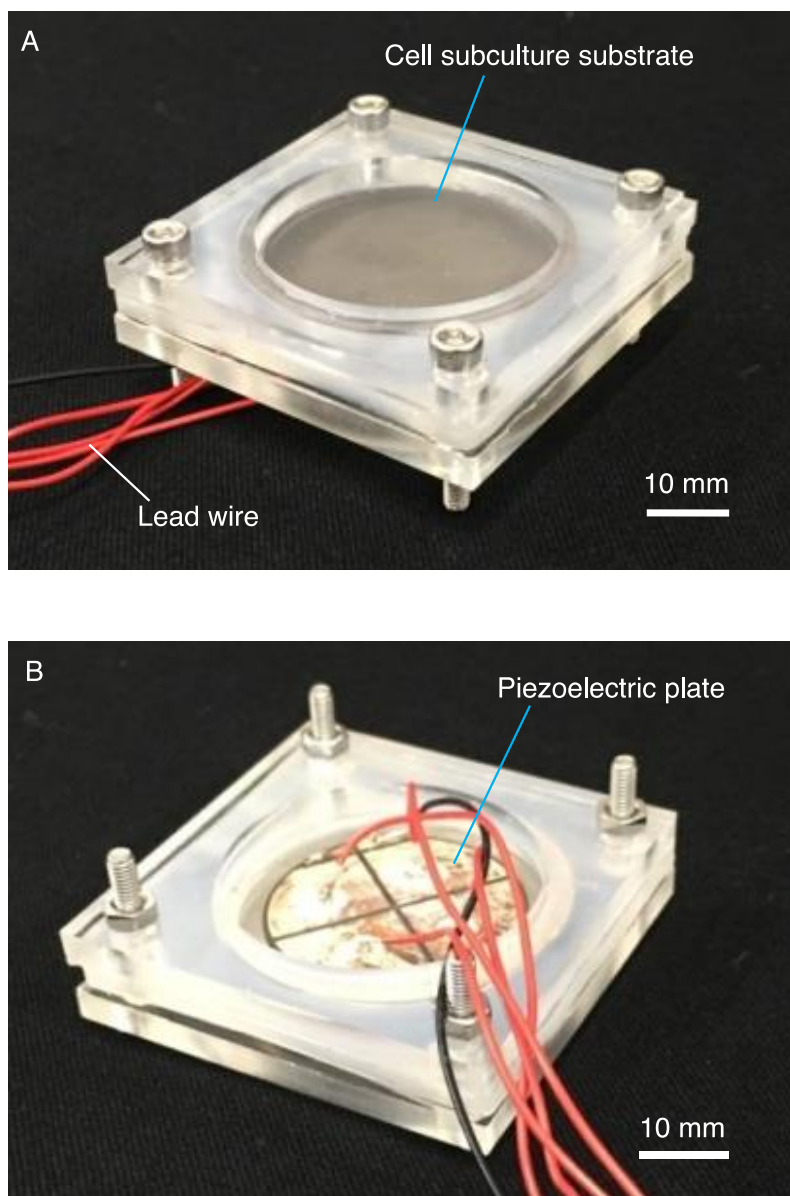


Figure 2-14. Fabricated cell patterning device. (A) Upside (B) Bottom side

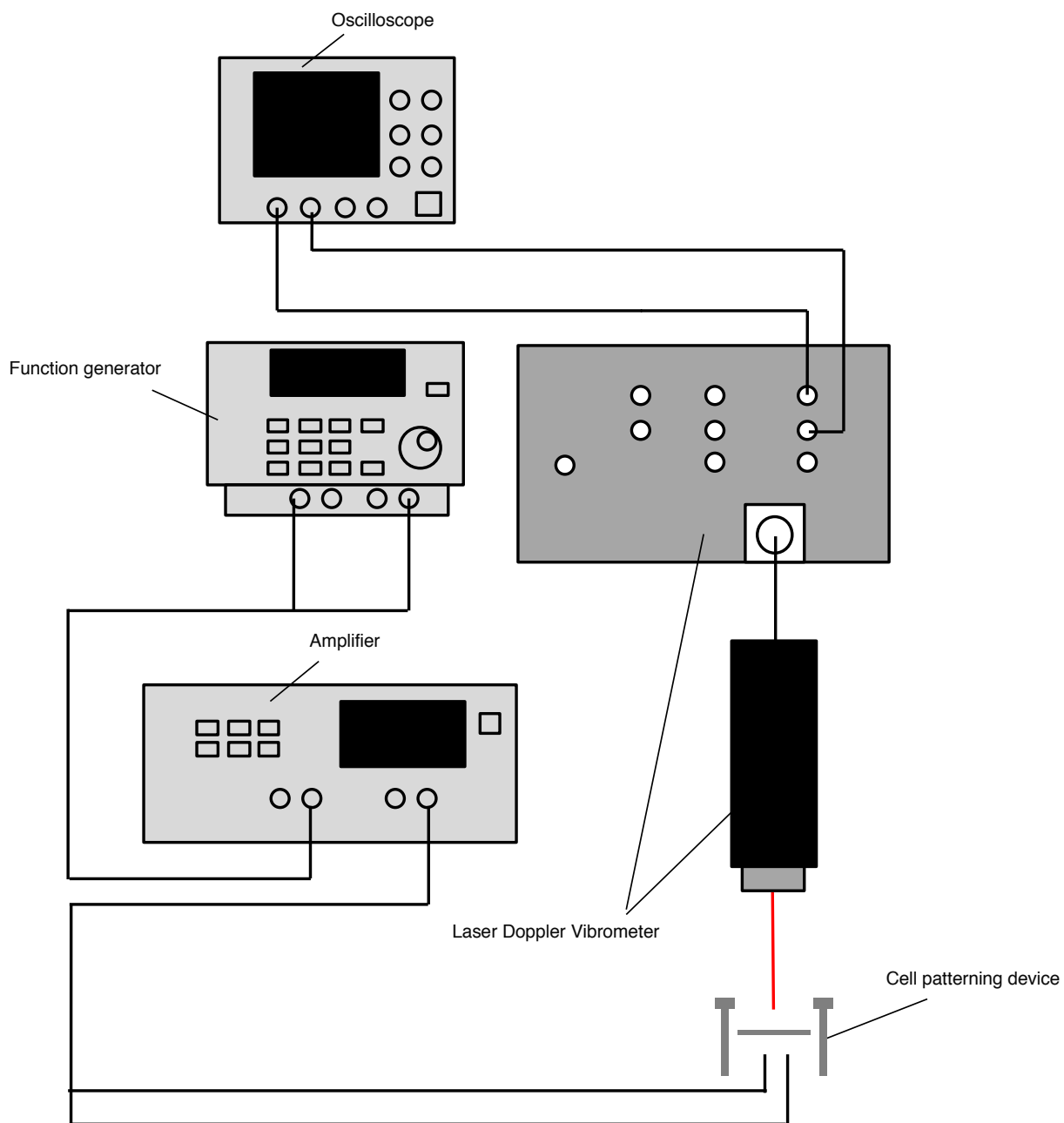


Figure 2-15. Schematic image evaluating the excited vibration on the cell culture substrate.

2.4.1 固有振動数の測定

本項では、培養基材にそれぞれの節の形状を有する固有振動モードを励振する際の固有振動数を測定する。すなわち、圧電素子の電極 A~D に 2.2.2 項で記したように交流電圧を印加し、圧電一構造連成解析に基づいて求めた固有振動数の近傍で入力電圧を変化させつつ、振動の腹での振動振幅を測定した。ここで、Figure 2-7 から円型の節を有する固有振動モードの振動の腹は培養面の中央であり、円型と十字型の節を有する固有振動モードの振動の腹は、中央から 12 mm 離れた位置の近傍である。なお、細胞パターンニング実験の際は、細胞パターンニングデバイス内に培地を 2 mL 配置するため、細胞パターンニングデバイスに 2 mL の培地を入れた状態で、それぞれの固有振動モードにおいて 30 V の交流電圧を印加して培養基材を振動させた。Figure 2-16 に入力電圧の周波数を変化させて測定した振動振幅を示す。なお、振幅はそれぞれの固有振動モードにおける最大振幅で正規化している。同図から、円型の固有振動モードの固有振動数は 6.2 kHz であり、円型と十字型の節を有する固有振動モードの固有振動数は 21.4 kHz であることがわかる。

2.4.2 入力電圧と最大振幅の関係の測定

本項では圧電素子に印加する電圧を変化させた際の振動の腹における最大振幅の変化を明らかにする。すなわち、入力電圧の周波数をそれぞれの固有振動モードを励振する固有振動数とし、電圧を変化させて振動の腹における振幅を測定した。Figure 2-17 に入力電圧と振動振幅の値を示す。同図より、入力電圧と最大振幅には比例関係がある。なお、印加電圧 V と最大振幅 A の関係は、それぞれの固有振動モードにおいて式 (2.4) (円型の節を有する固有振動モード)

$$A=0.1991V \quad (2.4)$$

と式 (2.5) (円型および十字型の節を併せ持つ固有振動モード)

$$A=0.7298V \quad (2.5)$$

で表された。これらの式から所望の最大振幅を持つ固有振動モードを励振する際に必要な印加電圧を決定できる。

2.4.3 振幅分布の測定

本項ではそれぞれの固有振動モードを励振した際の培養基材の振幅分布を明らかにする。印加電圧を 30 V、周波数をそれぞれの固有振動モードの固有振動数として培養基材に固有振

動モードを励振し、培養基材の中心より 4 mm 間隔で、中心から 12 mm 離れた位置まで振幅を測定した (Figure 2-18)。円型および十字型の節を併せ持つ固有振動モードの振幅分布を測

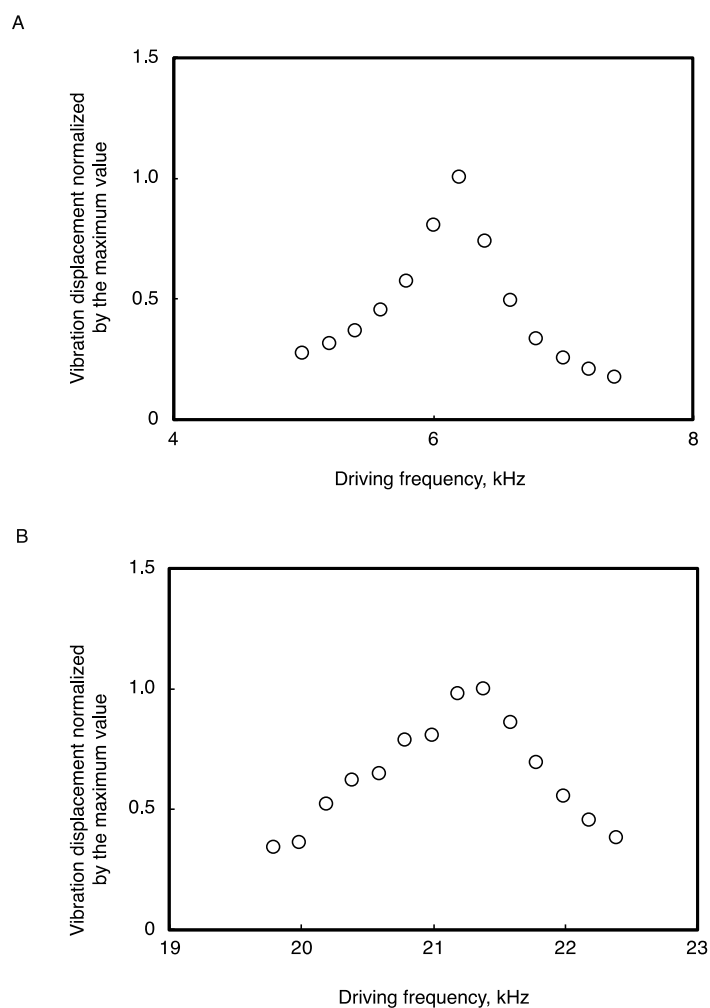


Figure 2-16. Relationship between driving frequency and normalized vibration amplitude (voltage, 30 V). The amplitude was in the out-of-plane direction and normalized to the maximum value at resonance. (A) Single nodal circle (B) Cross-circle node

定する際は、振動の腹と節をそれぞれ通過するように放射状に二方向に振幅分布を測定した。

Figure 2-19 に測定結果と圧電-構造連成解析結果との比較を示す。なお、振幅は最大振幅で正規化している。同図から、いずれの固有振動数においても、解析結果と類似した振幅分布の提示を確認した。ただし、振動位相は入力電圧と振動の位相差から判断した。以上のことから製作した細胞パターンニングデバイスの培養面に所望の固有振動モードが励振されていることを確認した。

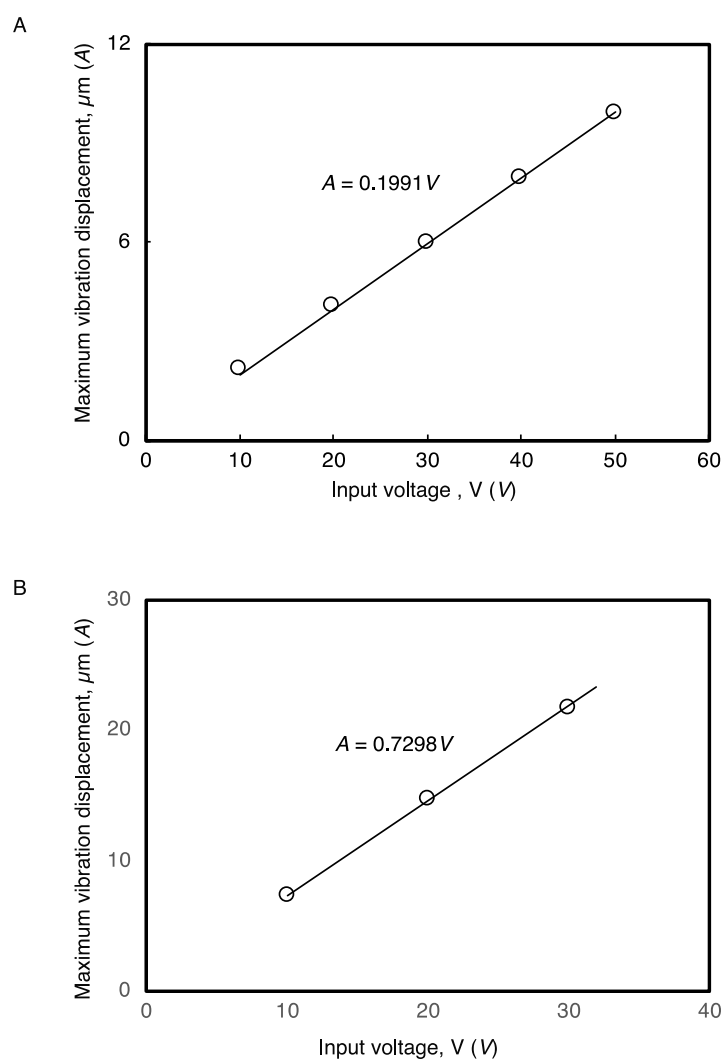


Figure 2-17. The relationships between input voltage and vibration displacement . (A) Single nodal circle. (B) Cross-circle node.

2.5 培養基材に励振した固有振動モードを用いた細胞パターンニング実験の方法

本節では、設計、製作、振動評価した細胞パターンニングデバイスを用いた細胞パターンニング実験の方法について述べる。

2.5.1 細胞パターンニングデバイスの滅菌

細胞を培養する際には、培地と呼ばれる培養液に浸漬する必要があることはすでに述べた。この培地はグルコースを始めとして、細胞に対する栄養素を多く含んでいる。すなわち、細

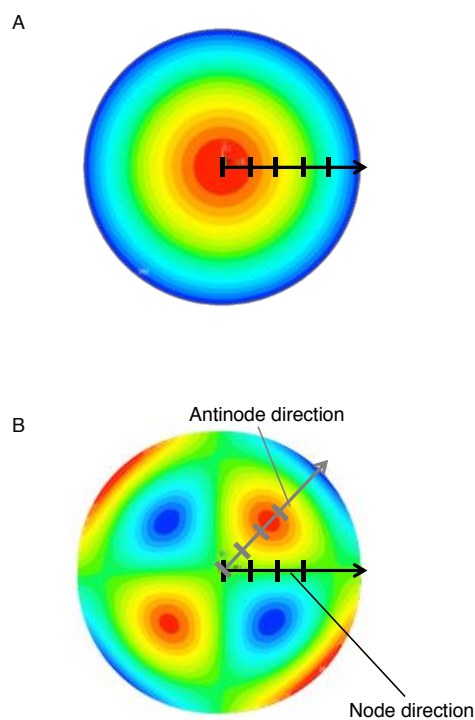


Figure 2-18. Positions where vibration displacements were measured with single nodal circle (A) and cross-circle nodal (B). Measurement was performed every 4 mm on the lines.

菌等にとっても増殖に適した環境である。そこで、細胞を扱う際は無菌状態を維持することが重要である。一般的には滅菌処理を施したディスポーザブルの培養容器を用いるが、本研究では細胞パターンニングデバイスを繰り返し使用するため、使用するごとに滅菌処理を施す必要がある。現在は、滅菌対象に応じた様々な滅菌方法がとられている。代表的な滅菌方法

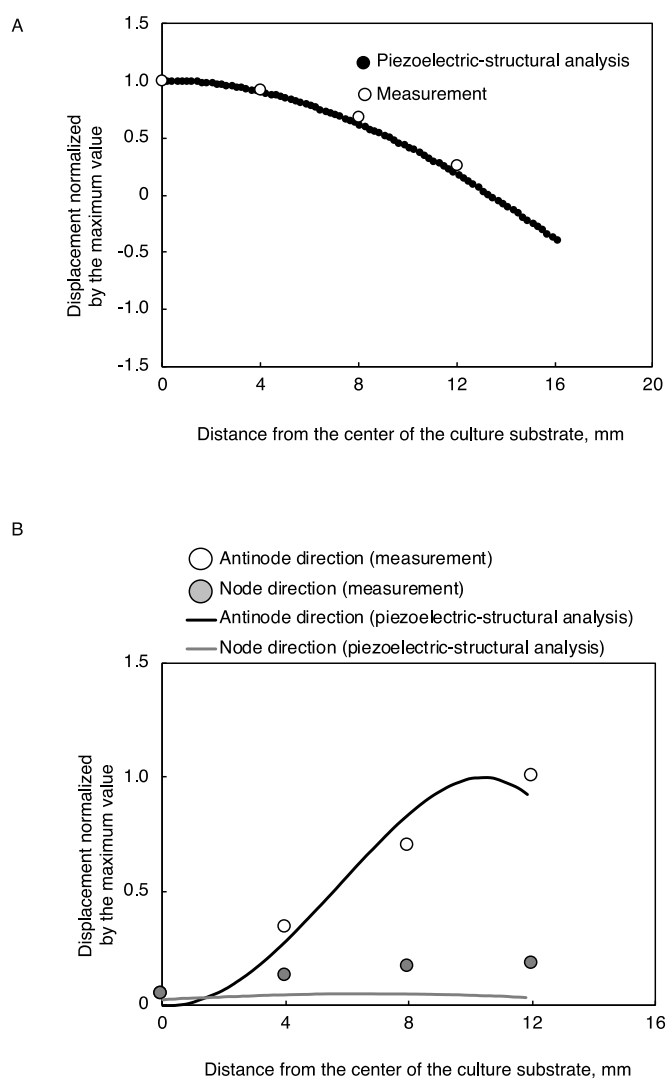


Figure 2-19. Comparison of measured and analyzed vibration displacement of the resonance vibration. (A) Single nodal circle. (B) Cross-circle node.

は、高熱による滅菌（干熱滅菌，オートクレーブ滅菌）である。しかし，これらの方法では滅菌対象物を高温にすることで滅菌するため，耐熱性のない機器の滅菌には適さない。ここで，本研究に用いる培養基材は SUS316L 円板と圧電素子をエポキシ系接着剤により加圧接着したものである。これを熱すると培養面である SUS316L の円板，エポキシ系接着剤と圧電素子の熱膨張率の差異から，ひずみが生じて，培養面から圧電素子の一部が剥離する可能性が考えられ，これが振動特性に影響する。このため，細胞パターンニングデバイスの滅菌には過酢酸（アセサイド 6% 消毒液，サラヤ株式会社）による化学的滅菌を採用した。すなわち，細胞パターンニングデバイスを 70% エタノールに 1 時間浸漬した後に，細胞パターンニングデバイスの細胞を培養するスペースをアセサイドによって 10 分間浸漬して滅菌を施した。その後，培養面からアセサイドを除去し，リン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered salts : PBS）を用いて 3 回洗浄した。

2.5.2 細胞の準備

本研究では仔ウシ由来軟骨細胞を用いた。軟骨細胞は先行研究に基づいて生後 4~6 週間の仔ウシの膝関節から採取した¹³⁰。膝の関節の骨頭から軟骨を 1 mm³ 程度の組織片に刻み，組織片を D-MEM/Ham's F-12 に 10% ウシ胎児血清（Fetal bovine serum: FBS），L-glutamine，および抗生物質を添加した培地に一晚漬けた。その後，PBS で洗浄した後，細かく粉碎し，先ほどの培地に 0.15 % コラゲナーゼタイプ I を加えて，インキュベータ内で 16 時間攪拌した。インキュベータ内の雰囲気は，温度 37°C，湿度 100%，二酸化炭素濃度 5% の状態となっている。組織片を含有した溶液をセルストレーナー（Falcon®70µm, Corning）でろ過することで残存した軟骨の破片を除去した。つぎに，細胞を遠心分離することで懸濁液から単離し，PBS を用いて 2 回すすぐことでコラゲナーゼを除去した。最後にバンバンカー（日本ジェネティクス株式会社）でピペッティングし，液体窒素中に冷凍保存した。なお，生細胞は株化細胞と異なり，継代を経てその機能が変化してしまう。このため，実験には 3 継代目の細胞のみを用いることとした。本実験では，この冷凍保存した細胞を解凍後，3 回継代し十分に脱分化させた軟骨細胞を用いた。また，細胞を培養するための培地には，FBS を 10% 加えた Ham-F12 を用いた。継代時は 0.05% トリプシンに 3 分間浸漬し，ピペッティングすることで細胞を剥離した。

2.5.3 細胞パターンニング実験の方法

細胞パターンニングの結果に影響すると考えられるパラメータとして，振動条件（振動数および振幅）に加えて細胞数が考えられる。しかし，固有振動モードを効率的に励振するため

には振動数は固有振動数に固定する必要があるため、細胞数と振動振幅をパラメータとして変化させて実験を行なった。ただし、円型の節を有する固有振動モードを用いた実験で細胞数がパターンニングに及ぼす影響を確認し、至適な細胞数の存在の有無を判断した後に、振幅をパラメータとして実験を行った。具体的な実験手順を以下に示す。

2.5.1 項に示した方法で滅菌した細胞パターンニングデバイスに、2.5.2 項に示した手順で準備した細胞を 2 mL の培地とともに播種した後に、固有振動を 2 時間励振させた状態で培養した。その後、培地内に浮遊している細胞と培養面に接着している細胞の数をそれぞれ測定した。細胞数の測定には血球計算版を用いて、トリパンブルー染色液によって生死判定も行なった。トリパンブルーとは、死細胞の細胞膜を透過して青色に染色する培養液である。さらに、培養面上の細胞分布を確認するために生細胞を Calcein AM (1 mg/mL) (calcein-AM solution 1 mL, 同仁化学研究所) を用いて蛍光染色し、倒立型蛍光顕微鏡 (ECLIPSE Ti; Nikon Corporation) を用いて観察した。Calcein AM は、生細胞の細胞質に存在する Ca と反応して染色する試薬である。Calcein AM は培地に含まれている FBS 内の Ca とも反応するため、振動の励振を停止した直後に培地を抜き取り、培養面を PBS で 3 回洗浄し、培地に含まれる Ca を除去した。さらに、これによって培地内を浮遊していた細胞は除去されて 2 時間の細胞パターンニング後の細胞分布を測定することが可能となった。染色の際は、無血清培地 2 mL に 4 μ L の Calcein AM を混合した染色液を用いて 30 分培養した。なお、Calcein AM は光により退色するため、染色は遮光した状態で行なった。倒立型蛍光顕微鏡により下方から培養面を観察するため、Figure 2-20 に示す観察用の治具を製作した。細胞分布の測定の際は培養基材中心から 16 mm

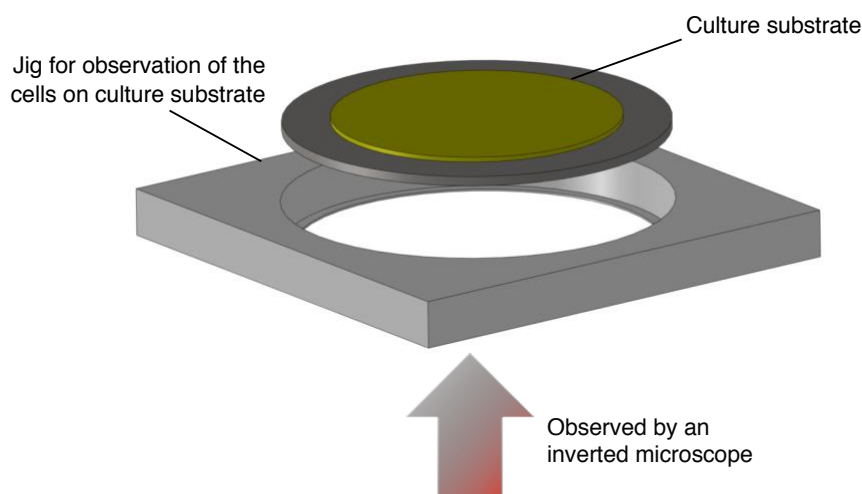


Figure 2-20. Schematic image of how to use jig for observation of the cells on culture substrate

離れた位置まで 4 mm ごとに蛍光写真を撮影して, それぞれの位置での細胞の密度を測定し, 中心からの距離と細胞密度の関係を調べた. 蛍光写真を撮影した箇所を Figure 2-21 に示した. なお, 細胞密度の測定には画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health) を用いた.

2.6 培養基材に励振した固有振動モードを用いた細胞パターンニング実験の結果および考察

2.6.1 細胞数とパターンニングの関係

本項では細胞数が細胞パターンニングに与える影響について, 円型の節を有する固有振動モードを例として用いて, 結果と考察を述べる.

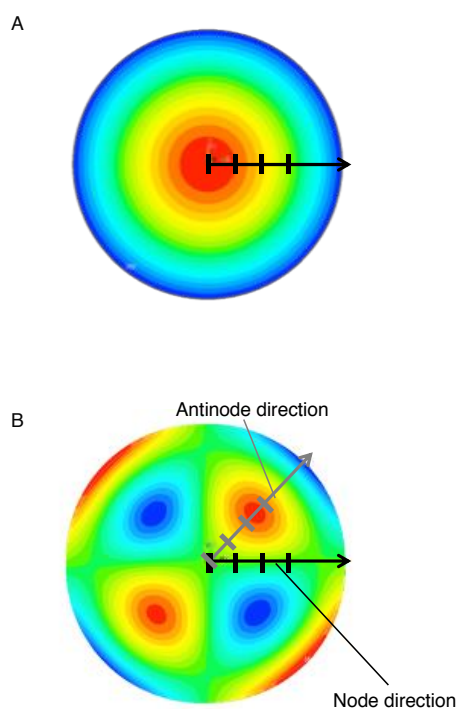


Figure 2-21. Positions where cell distributions were measured with single nodal circle (A) and cross-circle nodal (B). Measurement was performed every 4 mm on the lines.

振動数と最大振幅はそれぞれ 6.2 kHz と 4.5 μm で固定し、細胞数を 2.5×10^5 個と 5.0×10^5 個と変化させて実験を行なった。Figure 2-22 に 2.5×10^5 個の細胞を播種した際に撮影した蛍光写真を示す。緑色に染色されているものが生細胞である。定性的にはあるが、培養面中心では細胞数が少ないことが確認できる。同じように、 5.0×10^5 個の細胞を用いた時も蛍光写真を取得し、撮影した蛍光写真から細胞分布を測定した。それぞれの細胞数を用いた際の細胞分布を Figure 2-23 に示す。横軸は培養面中心からの距離、縦軸は各位置における細胞密度を平均の細胞密度で除したものを表している。細胞密度は、播種した細胞数を培養面の面積

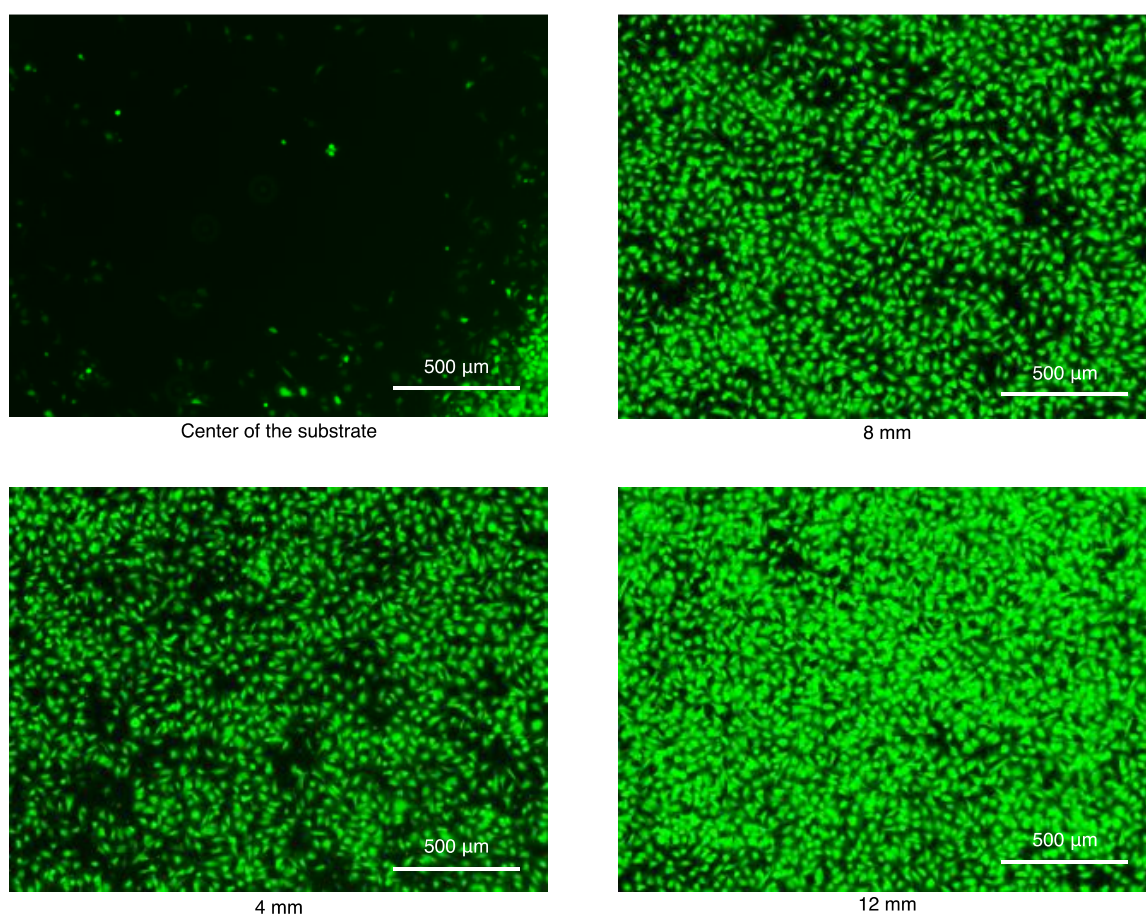


Figure 2-22. Images of live cells on culture substrate with cell patterning by resonance vibration having single nodal circle. The initial number of cells was 2.5×10^5 . The maximum vibration displacement was 4.5 μm .

で除することで算出した。なお、細胞密度は単位面積 (1 mm^2) あたりの細胞数と定義した。いずれも振動の条件は同一であったが、播種した細胞数が 2.5×10^5 個のときは 5.0×10^5 個のときと比較して細胞分布に偏りがあった。このことから、細胞数はパターニング結果に影響することが明らかになった。 2.5×10^5 個の細胞を播種したときの細胞分布に着目すると、培養面中心から 12 mm 離れた位置における細胞密度が高く、中心の細胞密度が低い。Figure 2-7 から培養面中心に振動の腹があり、中心から 12 mm 離れた位置付近に振動の節があることがわかる。このことより、細胞数が 2.5×10^5 個のときに振動の節近傍の細胞密度が大きく、腹の細胞密度が低いことがわかる。この結果から、 2.5×10^5 個の細胞を播種した際に、コンセプトに合致する細胞パターニングが可能であることが明らかになった。一方で、 5.0×10^5 個の細胞を播種した際のパターニングではこのような傾向は観察されなかった。これは、本研究で用いた細胞の性質に依存すると考えられる。本実験では、十分に脱分化した仔ウシ由来軟骨細胞を用いている。細胞は互いに積層せず培養面に平面的に接着するため、細胞数が多いと

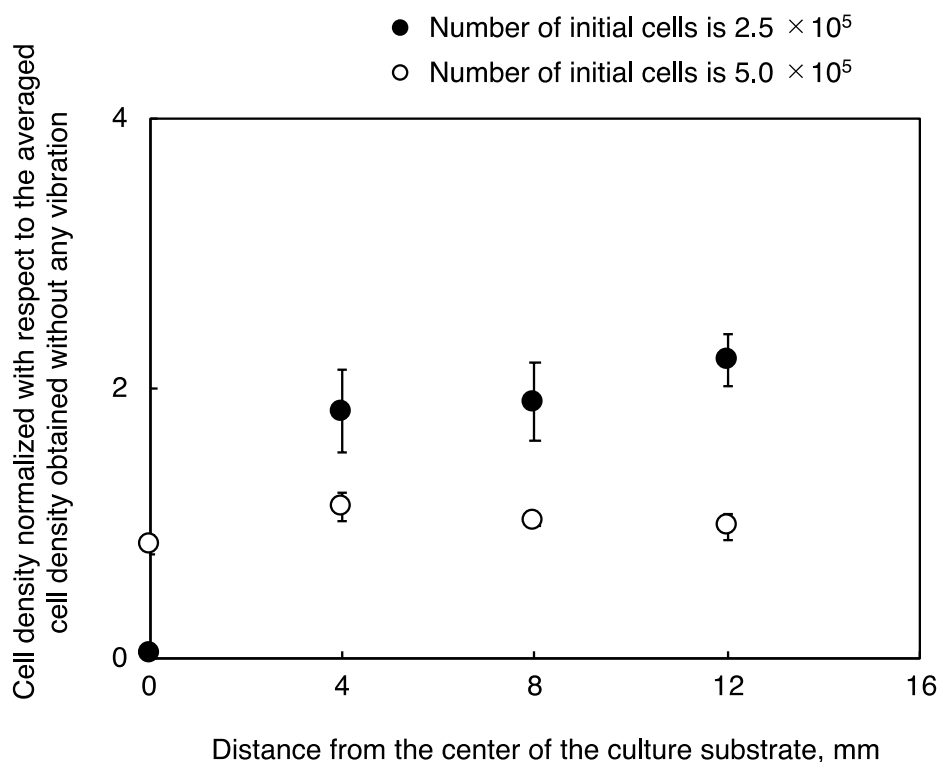


Figure 2-23. Cell distributions with different number of initial cells. (mean \pm SD, $n = 4$)

きには、節の近傍に集積した細胞が他の細胞が節の近傍に移動することを妨げていると考えられる¹³¹。

以上のことから、細胞パターンニングにおいて播種する細胞数がパターンニングに影響を及ぼすことが明らかになり、播種する細胞数に上限があることが示唆された。

2.6.2 振動振幅とパターンニングの関係

本項では、播種する細胞数を固定して、最大振幅をパラメータとして変化させることで、振動振幅が細胞パターンニングに与える影響を明らかにする。また、本項では2種類の固有振動モードを用いて実験を行う。それぞれの固有振動モードを用いたパターンニングの実験条件を Table 2-9 に記す。固有振動の節の面積がそれぞれの固有振動モードにおいて異なるため、播種する細胞数を変更した。測定した細胞分布を Figure 2-24 に示す。横軸は培養面中心からの距離、縦軸は細胞密度を表している。それぞれの固有振動モードにおける細胞分布を評価する。

まず、円型の節を有する固有振動モードを用いた際のパターンニング結果に関して論じる。Figure 2-19 から振動の腹と節は培養面中心と中心から 12 mm 離れた位置であるから、その2点において各最大振幅間の細胞密度を比較すると、培養面中心において細胞密度が最も低いのは最大振幅が 4.5 μm の際であり、中心から 12 mm 離れた位置で細胞密度が最も高いのも最大振幅が 4.5 μm の際である。このことから、コンセプトの細胞パターンニングは最大振幅 4.5 μm の際に可能であったと言える。

つぎに、円型と十字型の固有振動モードを用いた細胞パターンニングの際の細胞分布について論じる。Figure 2-19 で測定した振動分布と比較して、最大振幅が 1.5 μm の時、振動の腹に接着した細胞が振動の節と比較して少ないことがわかる。Figure 2-25 に最大振幅 1.5 μm の際に撮影した生細胞の蛍光写真を示す。こちらの図からもパターンニングの結果が確認できる。

以上のように培養基材に励振した固有振動モードを用いた細胞パターンニングには至適な最大振幅がある。これは、励振する振動が強くなると、音響流と呼ばれる体積流動が培地に発生することに起因する⁷⁴。この音響流によってコンセプトによる細胞のパターンニングが阻害されたと考えられる。

Table 2-9 Experimental condition of cell patterning experiment

Mode	Maximum vibration displacement, μm	Driving frequency, kHz	The number of cells, 10^5
Single circle	3.0/4.5/6.0	6.2	2.5
Cross-circle	1.0/1.5/2.0	21.4	5.0

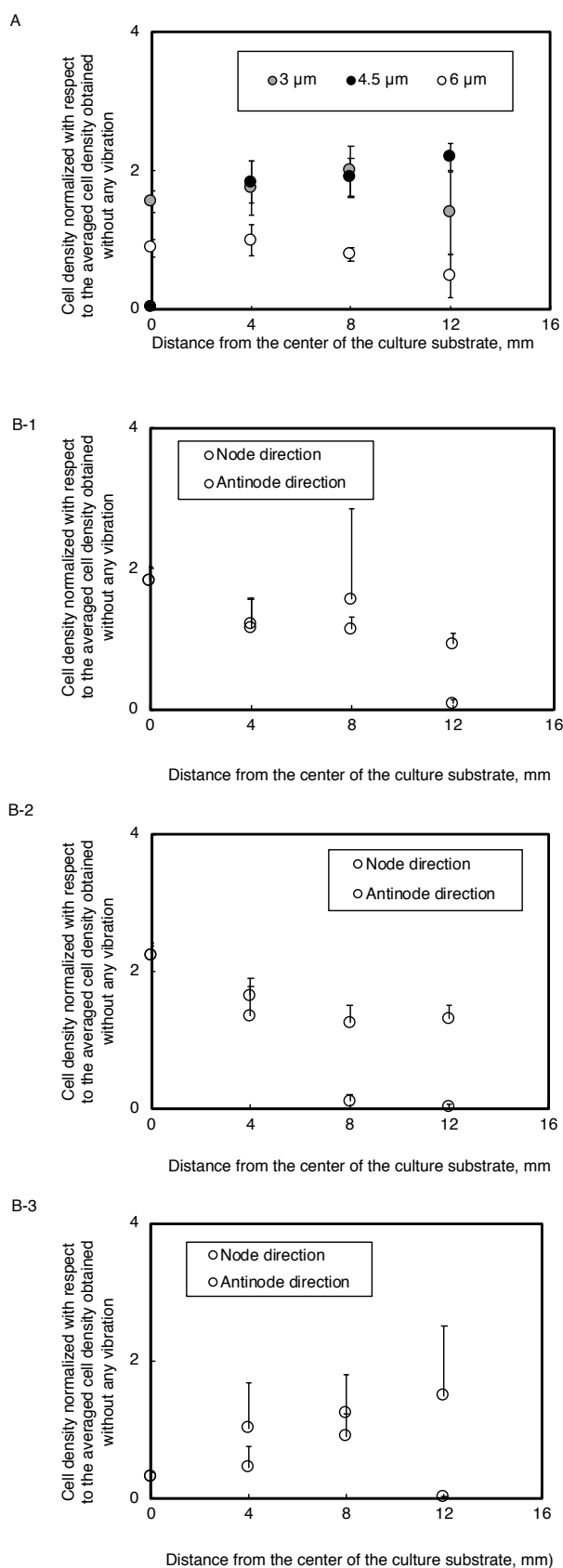


Figure 2-24. Cell patterning results with each maximum vibration displacement of the resonance vibration having single nodal circle (A) and cross-circle node (B). (B-1, 2, and 3) shows the results with maximum amplitudes of 1.0, 1.5, and 2.0 μm . Cell density was normalized to the cell density without vibration (mean + standard deviation, $n = 4$).

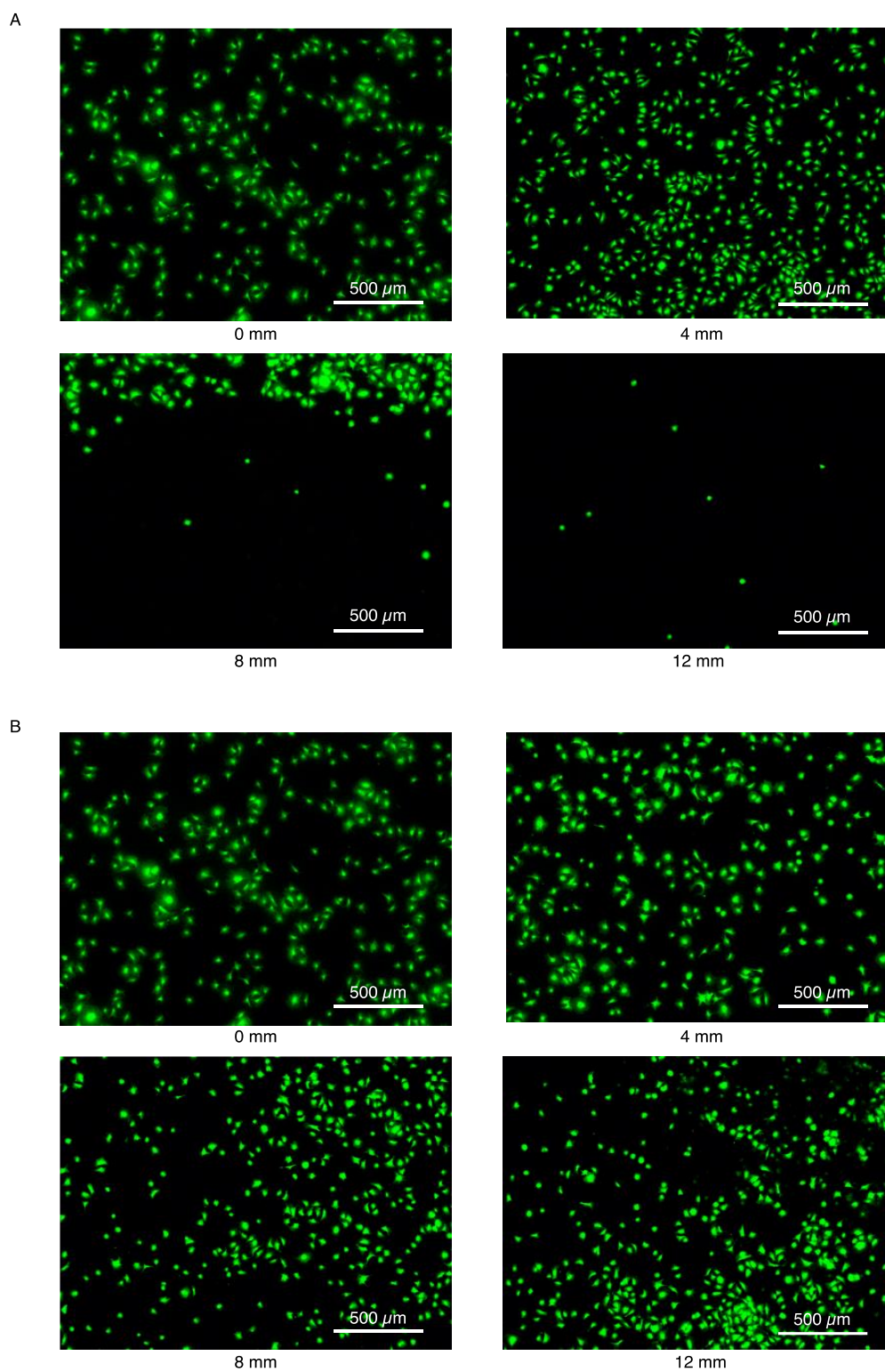


Figure 2-25. Cells stained with Calcein AM after cell patterning with cross-circle node having a maximum vibration displacement of 1.5 μm . (A) Along the antinode direction. (B) Along the node direction.

さらに、円型と十字型の節を併せ持つ固有振動モードにおける至適な最大振幅の振動を用いたパターンニングで、それぞれの細胞密度の測定位置における振動振幅と細胞密度の関係を Figure 2-26 に示す。この図から、振動振幅 A と細胞密度 D の関係は

$$D = -2.21A + 2.43 \quad (2-6)$$

のように表されることが明らかになった。さらに、本パターンニング手法において、細胞が接着するための振幅の閾値が存在することも示唆された。なお、円型と十字型の節を併せ持つ固有振動モードを振動数 21.4 kHz で励振した際の、細胞が培養面に接着する閾値は $1 \mu\text{m}$ 近傍にあることが明らかになった。

ここからは、培養面に接着した細胞数に関して結果と考察を述べる。励振する最大振幅と細胞の接着数との関係を Figure 2-27 に示す。同図より、円型の節を有する固有振動モードを励振した際の最大振幅が $4.5 \mu\text{m}$ 以下の際と、円型と十字型の節を併せ持つ固有振動モードを

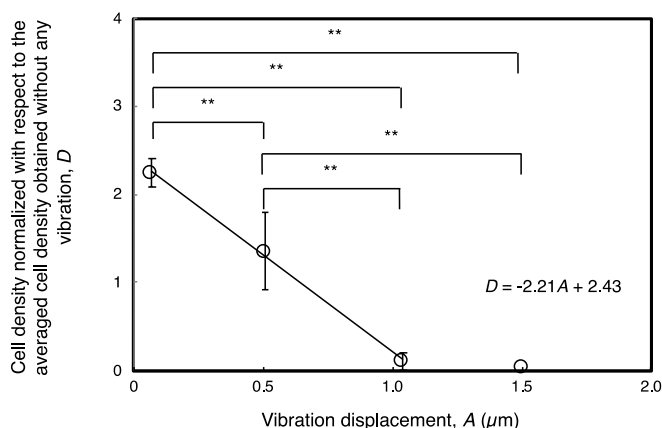


Figure 2-26 Normalized cell density as a function of vibration amplitude at a maximum amplitude of $1.5 \mu\text{m}$. Cell density was measured along the antinode direction and normalized to the cell density without vibration (mean \pm standard deviation, $n = 4$, **: $p < 0.01$). Linear regression is conducted with the data with the amplitude of $1 \mu\text{m}$ or smaller since the amplitude of $1 \mu\text{m}$ is obviously the threshold for the cell manipulation. This cell patterning was performed by resonance vibration having cross-circle nodal.

励振した際のすべての条件では、振動を励振していないときと比較して、培養面に接着した細胞数に有意差がなかった。一方で、円型の節を有する固有振動モードの最大振幅が $6\ \mu\text{m}$ のときは最大振幅が $4.5\ \mu\text{m}$ 以下のときと比較して、接着した細胞数および全細胞数が有意に少なかった。この減少した細胞数は、振動により破碎された細胞数と考えられる。血球計算盤で細胞数を数える際にはトリパンブルー溶液で染色したが、破碎された細胞は観察できないため数えることができない。振動によって細胞を破碎してタンパク質を抽出する装置がある

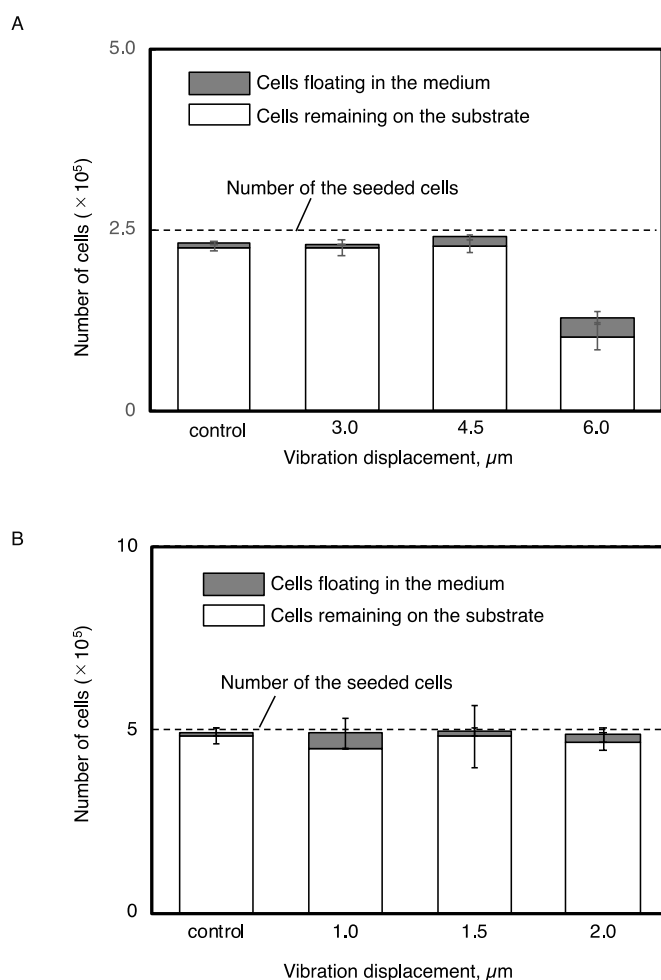


Figure 2-27. Relationship between the number of adhered and floating cells and maximum vibration displacement ($n = 3$). (A) Single nodal circle. (B) Cross-circle nodal.

ことから、本結果の妥当性が伺える¹³²。また、その他の条件では細胞が死滅していないことがわかる。振動の腹近傍と比較して節近傍における細胞密度が大きい場合、腹近傍に存在した細胞が振動により節近傍に集積されている可能性と腹近傍における細胞が剥離または死滅している可能性が考えられる。しかし、コンセプトの細胞パターニングが可能となった条件において、培養面に接着している細胞数は振動を励振していないものと同様である。このことから、もともとは腹近傍にいた細胞が節近傍に集積されているものと考えられる。すなわち、培養面の固有振動モードの節に生細胞をパターニングすることが可能であると明らかになった。

2.7 小括

本章では、金属 (SUS316L) 製の細胞培養面を有する細胞パターニングデバイスを設計、製作し、本研究における細胞パターニングのコンセプトを確認した。具体的には、以下の手段で研究を行なった。まず、培養面の固有振動を用いて細胞をパターニングすることを提案し (2.1 節)、固有振動を励振する培養面を製作するために、培養面として用いる SUS316L の円板に圧電素子を接着することで培養基材を製作 (2.2 節) した。次に、製作した培養基材を組み込んだ細胞パターニングデバイスを製作 (2.3 節) し、振動特性を評価 (2.4 節) した。最後に、製作、評価した細胞パターニングデバイスを用いて、2.5 節で述べた方法に従って細胞パターニング実験を行い、培養面の kHz 帯の固有振動を用いた細胞パターニングによって細胞が振動の節にパターニングされること、パターニングされた細胞は生存していたこと、用いる固有振動モードに応じた至適な振動振幅があることを明らかにした (2.6 節)。

3

汎用培養ディッシュ内における 超音波を用いた細胞パターンニング

前章において、kHz 帯の固有振動を培養面に励振することで、細胞のパターンニングができることを明らかにした。しかし、実際に再生医療や薬剤スクリーニングなどの医療現場に応用するには、細胞を観察する際の利便性や無菌状態の維持などの観点から、汎用的な細胞培養ディッシュなどの培養器において培養された細胞を用いる必要がある。そこで、本章では、汎用培養ディッシュ内において、超音波振動を用いて細胞をパターンニングする手法を確立する。

3.1 コンセプト

本章では、汎用的な培養ディッシュ内において超音波振動を用いた細胞パターンニング手法を具現化し、さらに超音波振動が細胞に与える影響を明らかにすることで、本研究の応用可能性を示す。前章では、機械的 Q 値が高く、振動の励振が容易な金属製の培養面の固有振動を用いることで細胞のパターンニングが可能であることを明らかにした。しかし、汎用的な培養ディッシュの培養面は、振動の減衰が大きい高分子ポリマーで構成されており、機械的 Q 値が低く振動を励振する際の効率が悪い。さらに、固有振動モードを励振するためには、物体の固有振動モードにおける振動の腹に圧電素子などのアクチュエータを接着して、固有振動数で加振する必要があるが、汎用的なディスプレイ培養ディッシュに対して、毎回のパターンニングごとに圧電素子を接着させるデバイスは、ランニングコストおよび作業効率の両側面から評価した際に現実的ではない。さらに、圧電素子は光透過性がないため、振動の腹近傍に接着した圧電素子によって位相差顕微鏡による細胞の観察が不可能になってしまう。そこで、本章においては前章で報告したパターンニングの原理に注目した。物体が振動すると、

その振動は媒質を介して、弾性エネルギーと運動エネルギーとの返還を繰り返しつつ伝播する。伝播する音響エネルギー I_E は

$$I_E = \frac{P(t)^2}{Z} \quad (3.1)$$

のように示される¹³³。ここで、 Z および $P(t)^2$ はそれぞれ媒質の音響インピーダンス、および音圧を表している。ここで、振動の伝播する媒質中に媒質以外の物質が存在すると、その境界面において、Figure 3-1 に示すように伝播する振動の音圧の一部が反射される。なお、入射波の音圧 P_1 と反射波の音圧 P_2 の関係および入射波の音圧 P_1 と透過波の音圧 P_3 の関係は、

$$P_2 = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1} P_1 \quad (3.2)$$

および

$$P_3 = \frac{2Z_2}{Z_2 + Z_1} P_1 \quad (3.3)$$

のようにそれぞれ表される¹。なお、 Z_A および Z_B は境界前後の物質の音響インピーダンスを表している。これに伴って、音響エネルギーの一部も反射されるため、境界面における音響エネルギーにエネルギー密度差が生じる。その結果として、この差を補うように相当する力が物体に加わる。この力を音響放射力と呼ぶ。細胞を培養する際は、液体である培地内に細胞を浸漬しており、培地の主成分である水の音響インピーダンスは $1.48 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{s/m}^3$ である。一方、細胞の音響インピーダンスは $1.60 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{s/m}^3$ と報告されている¹³⁶。これは、Hela細胞を用いた研究におけるものであり、細胞の種類や状態によってこの値は変化する可能性があるが、細胞はタンパク質で構成されており水と全く同じ音響インピーダンスを取る可能性は非常に

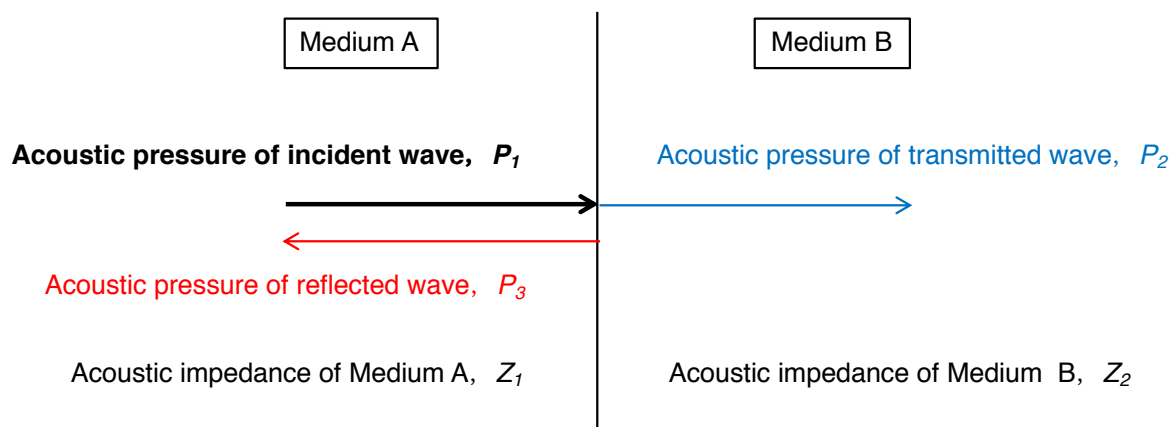


Figure 3-1. Reflection and propagation of traveling wave

少ない。さらに、超音波顕微鏡に関する研究からも細胞と培地の音響インピーダンスが異なることは明らかである¹³⁴⁻¹³⁶。このことから、細胞パターンニングの際は細胞が音響エネルギーの高い位置から低い位置にパターンニングされたことがわかる (Figure 3-2)。

上記の考察から、kHz 帯の固有振動モードを用いた細胞のパターンニングの際は培地内に音響エネルギーの分布を生じさせることで細胞のパターンニングが可能になった。この結果は、MHz 帯の超音波振動を用いた細胞のパターンニングで報告された結果と同様であり、妥当である^{73,137,138,139}。このため、汎用的な培養ディッシュに超音波振動を伝播させ、培養ディッシュの内部音響エネルギーの分布を生じさせる必要がある。そのために、培養ディッシュの下面に配置した超音波振動子の固有振動モードを励振し、そこから照射された超音波振動を培養ディッシュ内の細胞に伝播させる方法を着想した。Figure 3-3 にイメージ図を示す。超音波振動子から照射された超音波振動はカップリングリキッドを介して、培養ディッシュに到達し、培地内に伝播して音響エネルギーの分布を生じさせる。こうして生じた音響エネルギーの分布に従って細胞がパターンニングされると考えられる。

なお、本章の研究では、提案手法による細胞パターンニングのコンセプトを示すために、直径 35 mm の汎用的な細胞培養ディッシュ (細胞接着処理済み) を用いて細胞のパターンニングを行うこととした。

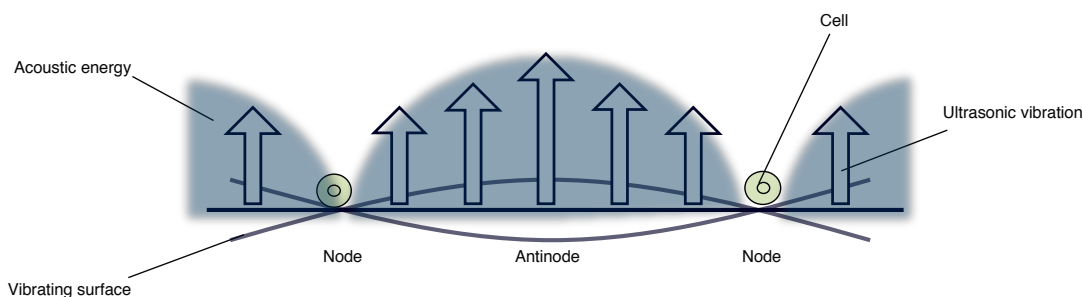


Figure 3-2. Principle of cell patterning using resonance vibration of culture surface

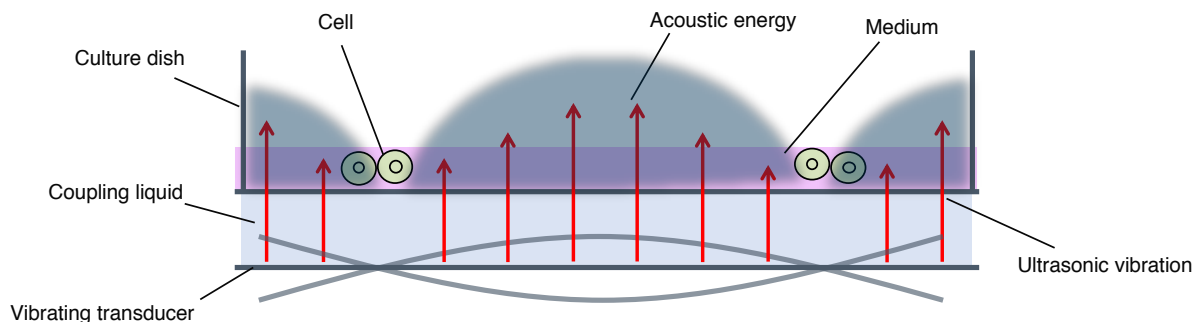


Figure 3-3. Principle of cell patterning using resonance vibration of culture surface

3.2 振動子の設計と製作

本節では、超音波振動子の設計と製作を行う。有限要素法による固有値解析および圧電-構造錬成解析を用いることで所望の固有振動モードを励振する振動子を設計、製作する。具体的には、本章では円型の節を持つ固有振動モードと円型と直線型の節を併せ持つ固有振動モードを選択的に励振できる振動子を設計、製作する。

湿度 100%の雰囲気を維持する細胞培養用のインキュベータ内で駆動することを考慮して、2章と同様に、機械的 Q 値が高く、腐食しない SUS316L 鋼を用いて振動子を構成する事とした。細胞培養用ディッシュ上で細胞をパターンニングする際に、直径 35 mm の細胞培養ディッシュ (3000-035, 関谷理化株式会社) を用いることを踏まえて、直径 35 mm, 厚さ 1 mm の円形の SUS316L 円板を用いることとした。細胞培養ディッシュの細胞培養面の形状と振動子の形状を一致させることで、振動子に励振された固有振動モードの振幅分布とパターンニングされた細胞の分布を比較することが容易になる。固有値解析した際に用いた SUS316L の物性値は Table 2-1 および Table 2-2 に示したものをを用いた。なお、固有値解析には有限要素法解析ソフト ANSYS Ver 16.0 を用いて、振動子の境界条件は自由端、要素形状は正四面体、要素数は 84768 とした。この条件において振動振幅の計算値は 0.1%以下に収束しているため、妥当な条件と考えている。

Figure 3-4 に、上記の条件を用いて行った固有値解析により求めた円型の節を 1 つ有する固

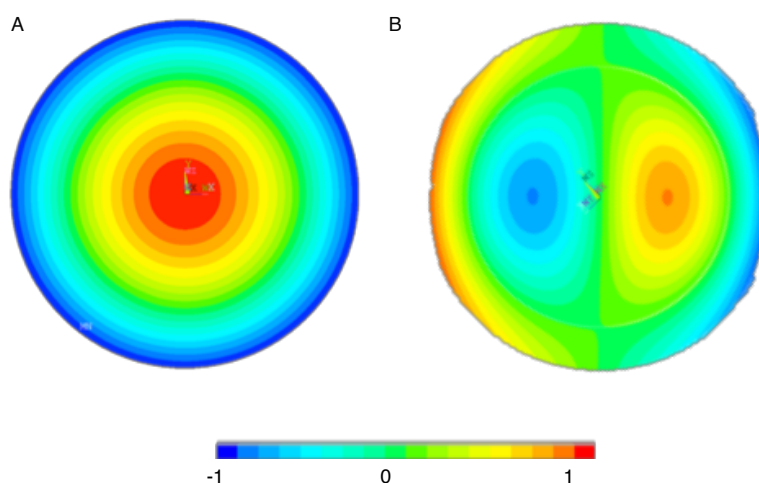


Figure 3-4. Eigenvalue analysis (ANSYS 16.0). Colored bar indicates out-of-plane displacement normalized to the maximum amplitude. A: Resonance vibration having single nodal circle (vibration frequency, 8.7 kHz). B: Resonance vibration having line-circle nodal pattern (vibration frequency, 16.6 kHz).

有振動モードおよび円型と直線型を併せ持つ形状の節を有する固有振動モードを示す。なお、図中のカラーバーはそれぞれの固有振動モードにおける最大振幅で正規化した相対振幅を示している。同図からわかるように、それぞれの固有振動モードの固有振動数は、8.7 kHz および 16.6 kHz である。

SUS316L 鋼に対して圧電素子を接着させ、交流電圧を印加することで固有振動モードを励振する。なお、これ以降、直径 35 mm の SUS316L 鋼に対して圧電素子を接着させたものを振動子と呼称する。振動子に効率的にそれぞれの固有振動モードを励振するためには、振動励振に用いる圧電素子の形状および SUS316L 鋼の円盤と圧電素子との接着位置関係を適切に決定し、励振する固有振動モードの腹の近傍において固有振動数に対応した周期的なひずみを発生させる必要がある。使用する圧電素子の形状および接着位置は有限要素法による圧電-構造連成解析を用いて決定した。ただし、圧電素子のデザインは、2章で用いたものを適用して解析を行った。振動子の境界条件は自由端として、解析の際には Table 2-1, Table 2-2, Table 2-4~Table 2-7 に示した物性値を用い、各部品の寸法に関しては Table 3-1 に示した。なお、圧電-構造連成解析には有限要素法解析ソフト ANSYS Ver 16.0 を用いて、振動子の境界条件は自由端、要素形状は正四面体とした。圧電素子の電極に印加する交流電圧の入力周波数を変化させ、励振される固有振動モードを確認した。ただし、それぞれの固有振動モードを励振する際は、圧電素子の分割された電極表面に対して Figure 3-5 に示すように交流電圧を印加した。なお、入力する交流電圧は 10 V とした。圧電-構造連成解析の解析結果を Figure 3-6 に示す。同図より、周波数 9.9 kHz および 19.3 kHz の交流電圧を入力すると円型の節を 1 つ有する固有振動モードおよび円型と直線型を併せ持つ形状の節を有する固有振動モードがそれぞれ励振されることがわかる。Figure 3-6 で示されている振幅分布は、Figure 3-4 で示されたものと十分類似しており、設計した圧電素子、その接着位置、および電圧印加の方法によって、それぞれ所望の固有振動を励振できると言える。

以上の検討結果に基づき圧電素子の電極配置および、SUS316L 鋼の円盤と圧電素子から構成された振動子の詳細を Figure 2-5 および Figure 3-7 のように決定した。

Table 3-1 Dimension of the ultrasonic transducer

	SUS316L plate	Piezoelectric substrate	Adhesion layer
Diameter, mm	35	30	30
Thickness, mm	1	0.5	0.001

振動子の製作は前章の 2.2 節に示した培養基材の製作方法に従って行なった。具体的には、Figure 3-8 に示した寸法で圧電素子と SUS316L 円盤とを接着する治具を製作した。本治具には、構成部品の治具への接着防止に加えて、加圧時に全面を均一に加圧することが求められ

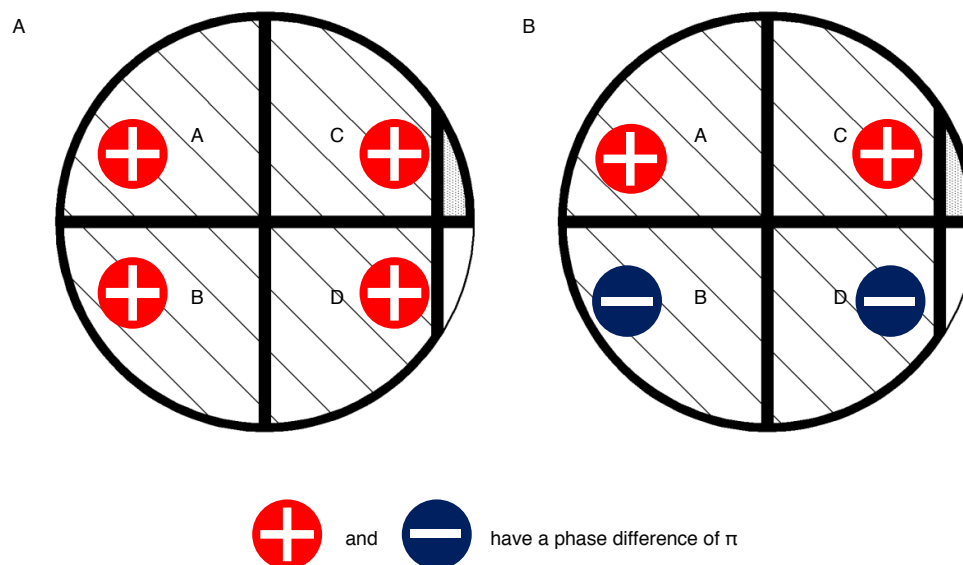


Figure 3-5. Method of inputting AC voltage on the piezo electric substrate. (A) Resonance vibration having single nodal circle. (B) Resonance vibration having line-circle nodal pattern.

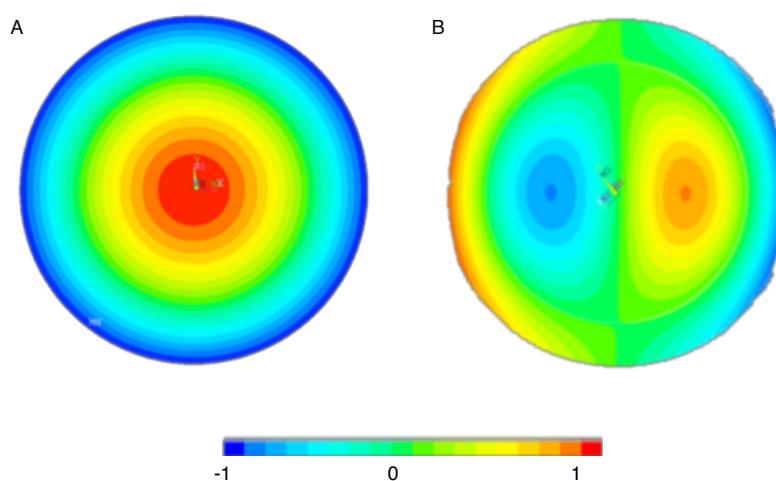


Figure 3-6. Piezoelectric structure coupled analysis (ANSYS 16.0). Colored bar indicates out-of-plane displacement normalized to the maximum amplitude. A: Resonance vibration having single nodal circle (vibration frequency, 9.9 kHz). B: Resonance vibration having line-circle nodal pattern (vibration frequency, 19.3 kHz).

る。このため、非粘着性で弾性率の低いポリアセタールを用いて接着治具を製作した。Figure 3-9に示すように、治具に対して、圧電素子と SUS316L の円盤を挿入し、2.2.3 項に記した手法に従ってこれらを接着することで振動子を製作した。

3.3 細胞パターンニングデバイスの設計と製作

細胞を培養する際は、無菌状態の維持、光学顕微鏡を用いた観測が可能、取り扱いが容易、などといった観点から、細胞培養用の汎用的なディスポーザブル培養ディッシュを用いることが理想的である。このため、前説で製作した振動子から照射する超音波振動を効率的に汎用培養ディッシュ内に伝播する細胞パターンニングデバイスを設計した。

3.3.1 カップリングリキッドの選定

固有振動する振動子の表面から伝播する振動を効率的に細胞培養用ディッシュ内に伝播させるためには、振動子と細胞培養用ディッシュの間にある間隙を、細胞培養用ディッシュの材質であるポリスチレンの音響インピーダンスに近い媒質で満たすことが有効である[式 (3.3)]。ポリスチレンの音響インピーダンスが $2.49 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{s/m}^3$ であることを鑑みて、音響インピーダンスが $2.43 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{s/m}^3$ であるグリセリン (17029-00, 関東化学) をカップリン

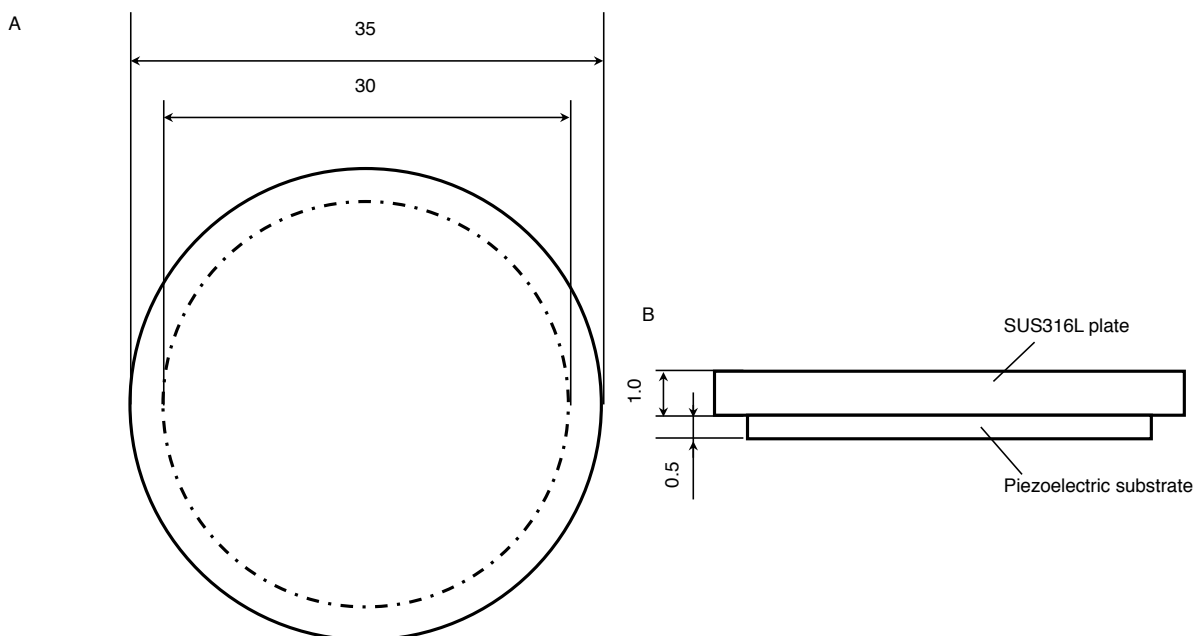


Figure 3-7. Dimension of the vibration transducer (A) Upper view. (B) Side view.

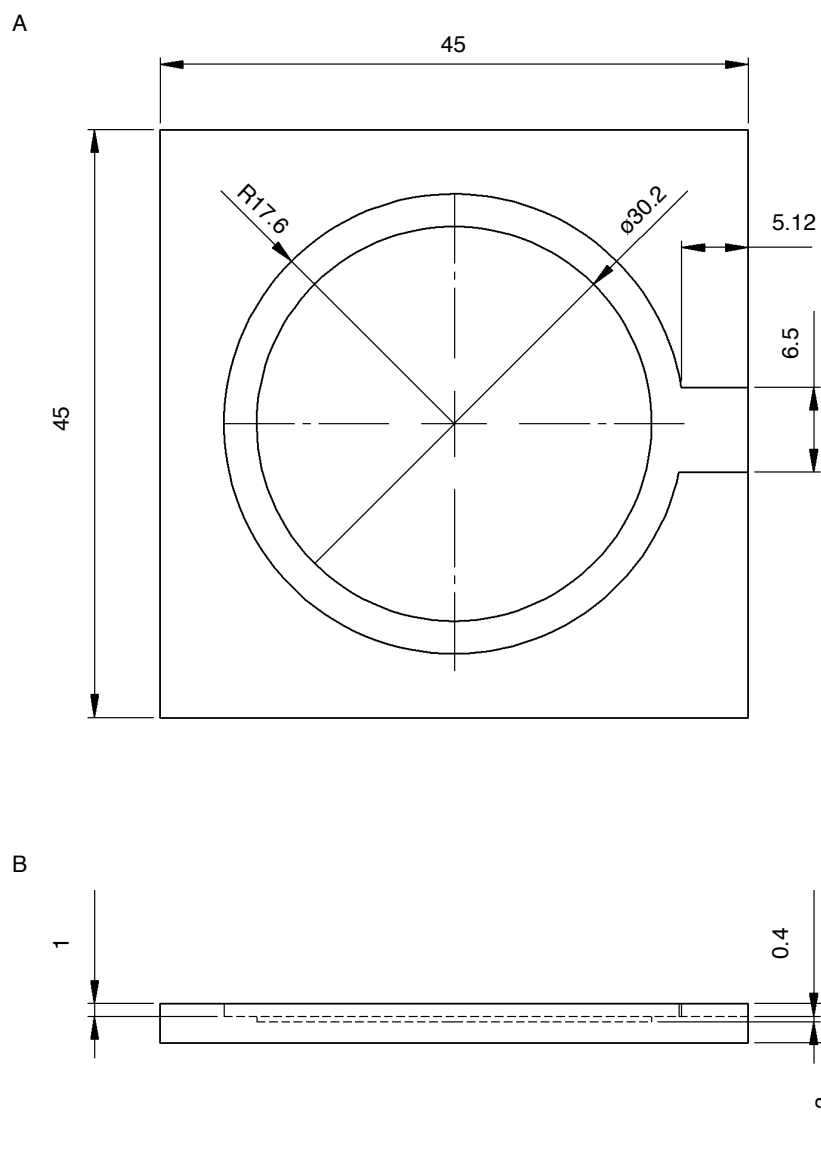


Figure 3-8. Dimension of the jig attaching piezoelectric substrate to SUS316L plate. (A) Upper view. (B) Side view

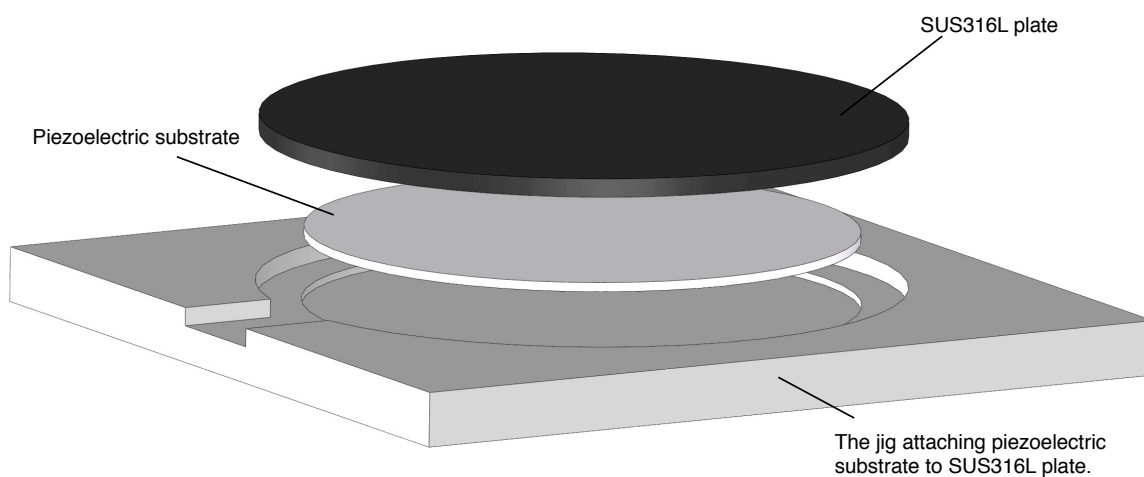


Figure 3-9. Schematic image to show how to use the jig attaching piezoelectric substrate to SUS316L plate.

グリキッドとして用いて間隙を満たすこととした。しかし、振動を伝播させる際に、振動子と細胞培養用ディッシュが直接接触していると、細胞培養用ディッシュに予期せぬ衝突振動が発生する恐れがある¹⁴⁰。これを避けるために、振動子の直上にはシリコーンゴムを配置することとした。なお、シリコーンゴムの音響インピーダンスは $1.20 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{s/m}^3$ であり、グリセリンの音響インピーダンスと比較的近い¹⁴¹。さらに、細胞培養用ディッシュの内部を満たす細胞を培養するための培地の音響インピーダンスは水と近似できるため、 $1.48 \times 10^6 \text{ N} \cdot \text{s/m}^3$ と考えられる。上記の条件をまとめると、吸収減衰を考慮しない際、式 (3.3) から振動子に励振された固有振動により伝播した振動振幅の 81.9%の振幅を持つ振動が細胞培養用ディッシュ内の培地に伝播することがわかる。しかし、実際はカップリングリキッドであるグリセロールは粘性が高いため、振動の減衰を引き起こしやすい。ここで、振動の減衰係数は

$$\alpha = \frac{\omega^2 \nu}{2c^3} \left[\left(\frac{4}{3} + \frac{\mu_B}{\mu} \right) + \frac{\gamma - 1}{Pr} \right] \quad (3.4)$$

のように表される¹⁴²。なお、 ω , ν , c , μ_B , μ , γ と Pr は、それぞれ角周波数、動粘度、音速、体積粘性係数、せん断粘性係数を表している。ここで、最も減衰が大きく影響するグリセリン 100%の条件におけるそれぞれの値を代入すると、減衰係数は $1.02 \times 10^3 \text{ m}^{-1}$ となる¹⁴³⁻¹⁴⁷。さらに、グリセロールの厚さは $700 \mu\text{m}$ であることと、Fig. 3-6(B)から予測される最大の駆動周波数は 19.3 kHz であることから式 (2.1) に上記の値を代入すると、グリセロールにおいて減衰する振動速度は 0.714% であることがわかる。なお、振動数は変化しないため減衰する振動振幅は 0.714% であることがわかる。すなわち、設計した構造を用いることで効率的に振動を伝播させることが可能である。

3.3.2 デバイス全体の設計および製作

前項で述べたように、振動子から照射される振動を効率的に細胞培養用ディッシュ内に伝播するため、振動子と細胞培養用ディッシュの間にはシリコーンゴムとグリセリンを配置する。この際に、空気などの音響インピーダンスが大きく異なる物質（空気の音響インピーダンスは $4.10 \times 10^2 \text{ N} \cdot \text{s/m}^3$ である）が振動子と細胞培養ディッシュの間に混入すると、その境界面で振動は反射し、振動の効率的な伝播を阻害する。そこで、シリコーンゴムを振動子の上に直接焼成し、グリセリンを保持するチャンバの底面とした。これによりシリコーンゴムと振動子との間への空気の混入を防いだ。

細胞パターンニングデバイス全体の構造を Figure 3-10 に示す。同図に示すように、本デバイスは振動子とシリコーンゴム部品とアクリル部品（アクリルカバーおよびアクリルベース）から構成されている。振動子は 3.2 節で設計・製作した直径 35 mm 、厚さ 1 mm の SUS316L 製の振動基材の下面にアクチュエータとして圧電素子を接着し、電極に導線を半田付けした

ものである。この振動子がシリコーンゴム部品に埋め込まれた状態で把持され、アクリル部品によってシリコーン部品を挟み込むことにより、グリセリンを保持するチャンバを構成した。これらの部品の固定にはボルトとナットを用いた。なお、本デバイスを用いて細胞をパターンニングする際の培養環境を通常時と同等にするため、デバイスを細胞培養用のインキュベータ内に配置する。インキュベータ内は生体内の環境を模擬しており、湿度 100%の雰囲気を持している。このため、腐食を防止するためにボルトとナットは SUS304 ステンレス鋼製とした。なお、アクリル部品でシリコーンゴム部品を挟み込み、ボルトとナットにより加圧することで振動子を固定しているが、Figure 3-10 に示したように、振動子の上方にはアクリル

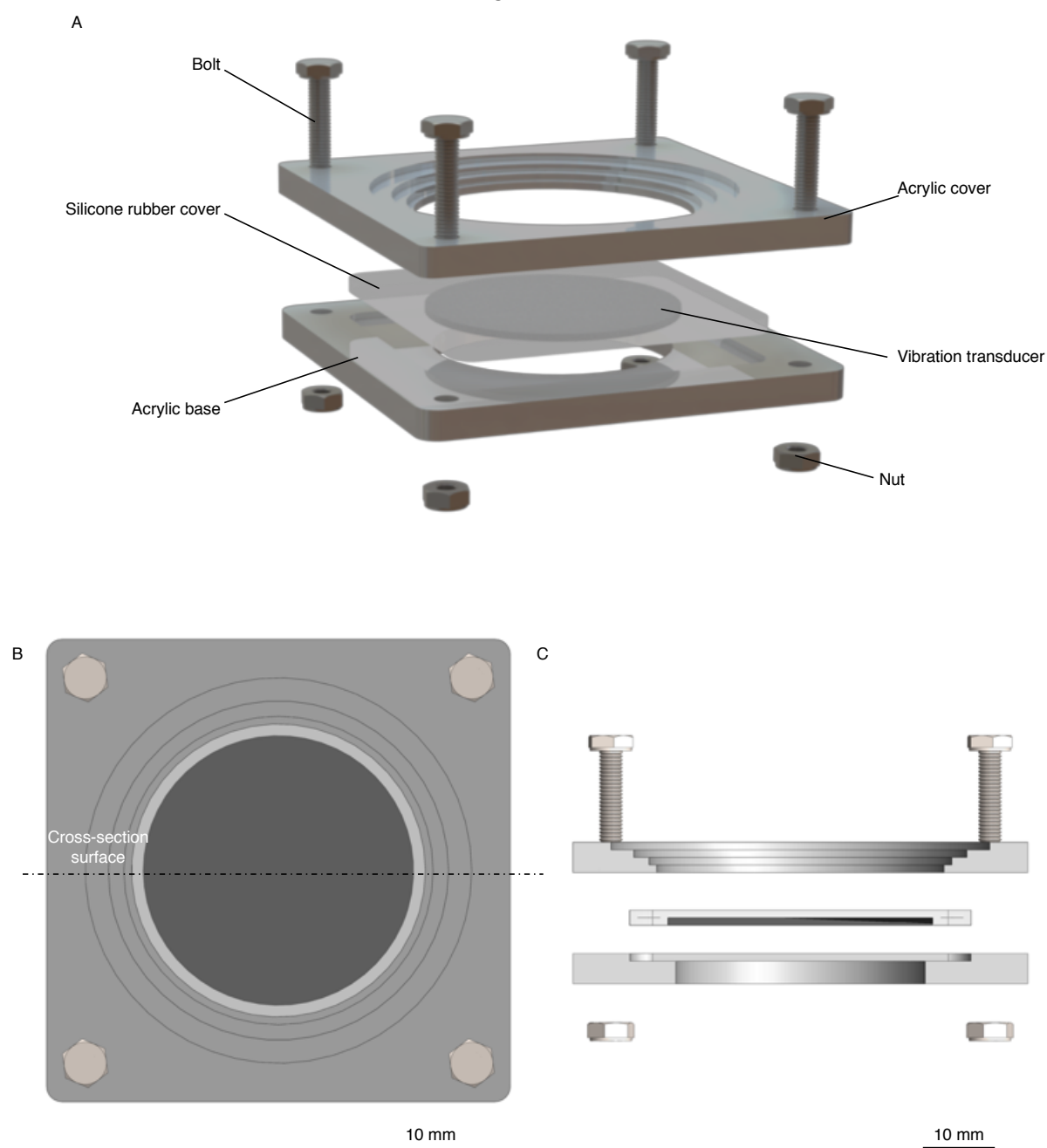


Figure 3-10. Design of the cell patterning device. (A)Over view (B) Upper view. (C)Cross-section view

リル部品は存在せず，シリコン部品のみを加圧している．このため，振動子の境界条件は自由端に模擬されている．

なお，Figure 3-10 に示したように，アクリルカバーの上面は階段状に切削されている．このデザインによって，細胞培養ディッシュをチャンバに配置する操作が容易になり，コンタミネーションのリスクを減じている．アクリルカバーの最下段の直径および深さは細胞培養用ディッシュを配置することを鑑みて，38 mm および 1 mm とした．Figure 3-11 にアクリルカバーの寸法を示す．

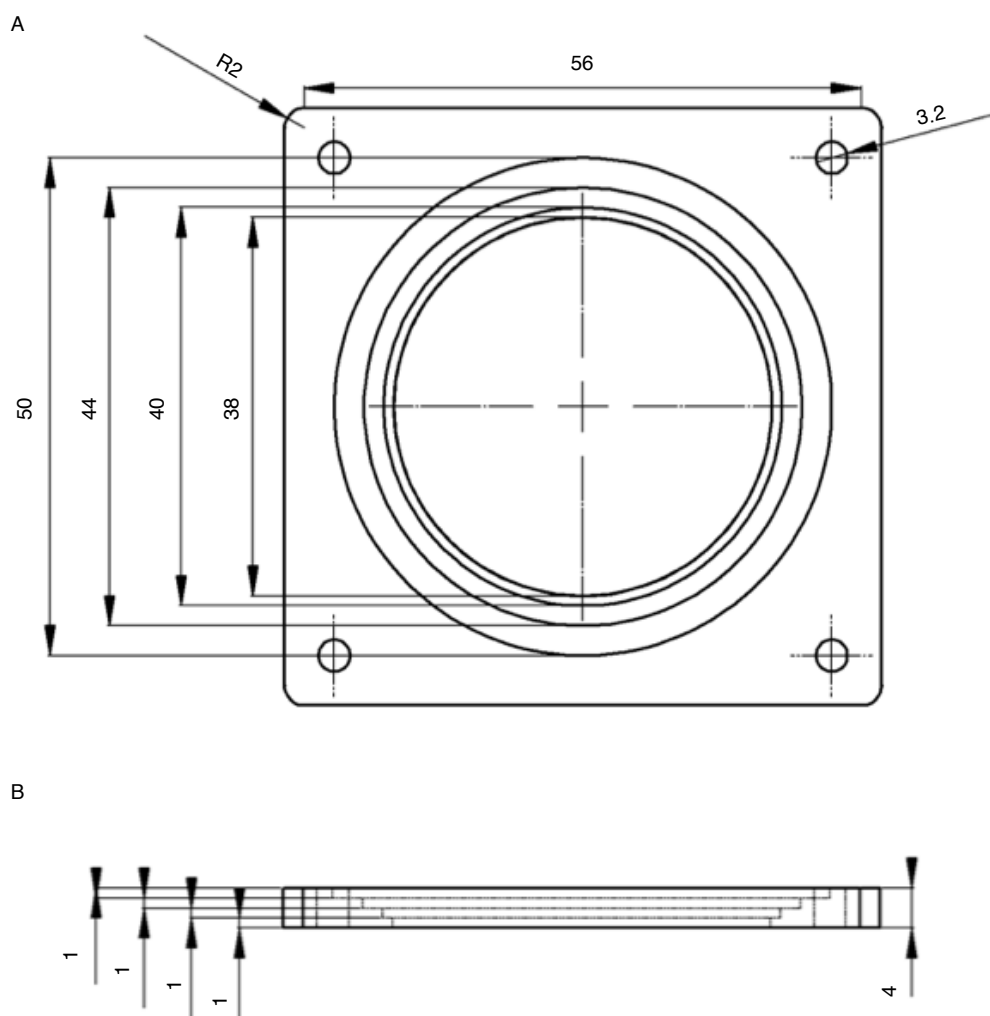


Figure 3-11. Dimension of the acrylic cover

上記で設計したデバイスを製作した。アクリル部品は切削加工を施すことにより製作した。シリコーンゴム部品は切削加工により製作した Figure 3-12 に示す鋳型を用いて製作した。この鋳型の材質には、シリコーンゴムを焼成する際のことを鑑みて、シリコーンゴムが接着しにくく、融点が高いポリエーテルイミドとした。鋳型の中央部に位置する円板型の空間の直径は振動子の下面中央に接着した圧電素子の直径に対応しており、Figure 3-13 に示すようにこの空間に圧電素子をはめることで、振動子を本鋳型に固定し、硬化前のシリコーンゴム (KE1316, 信越化学工業株式会社) に、重量の 10 wt% の硬化剤 (CAT1316, 信越化学工業株式会社) および 20 wt% の希釈剤 (RTV シンナー, 信越化学工業株式会社) を混合したシリコーンゴム混合液を流し込んだ。ただし、本操作の前に、あらかじめこの混合液を真空チャンバ (真空デシケーター VL-C 型, アズワン株式会社) 内に配置し、真空ポンプ (ULVAC G-50SA, ULVAC KIKO Inc.) を用いて真空チャンバ内を減圧することで脱泡した。さらに、混合液を鋳型に流し込んだ後に、鋳型から溢れた混合液を除去し、再度脱泡した。つづいて、オーブン (Isotemp Vacuum Oven Model 280A, Fisher Scientific) 内に配置し、60°C で 24 時間焼成した。これらの部品を先述したように組み立てて、細胞パターンニングデバイスを製作した。製作した細胞パターンニングデバイスを Figure 3-14 に示す。

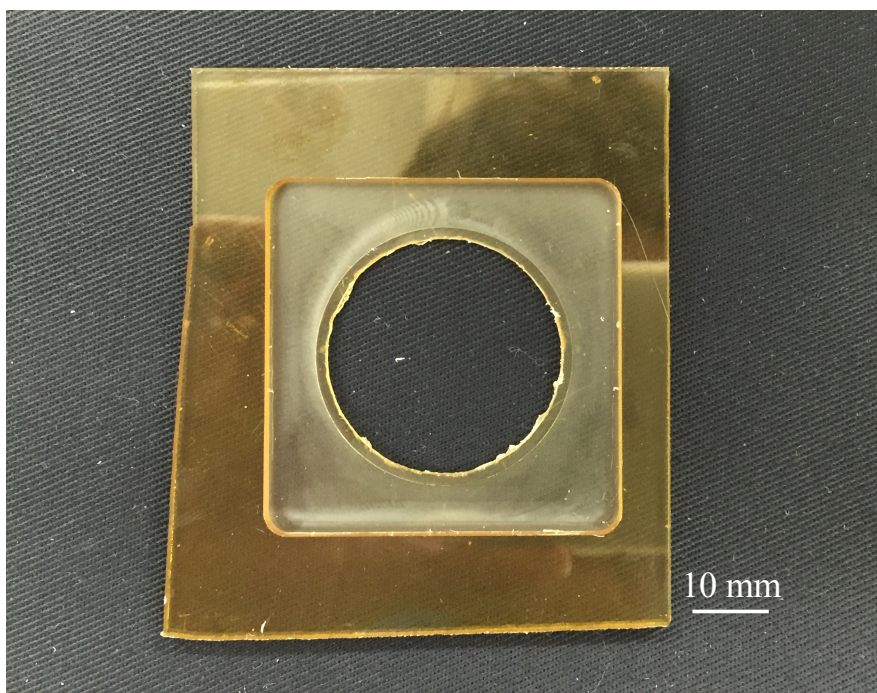


Figure 3-12. Mold fabricating silicone rubber on the vibration transducer

3.4 細胞パターンニングデバイスの振動特性の評価

本節では製作した細胞パターンニングデバイスの振動特性を評価する。細胞パターンニングデバイスの振動子に励振した振動の振幅を測定する際は、Figure 2-15 に示したように圧電素子に対してファンクションジェネレータとアンプを用いて振動を励振して、レーザドップラ振動計とオシロスコープを用いて、振動子の振動速度を測定し、ここから振幅を計算した。

なお、以降は円型の節を持つ固有振動モードを励振して振動の評価を行なった際の結果を示す。

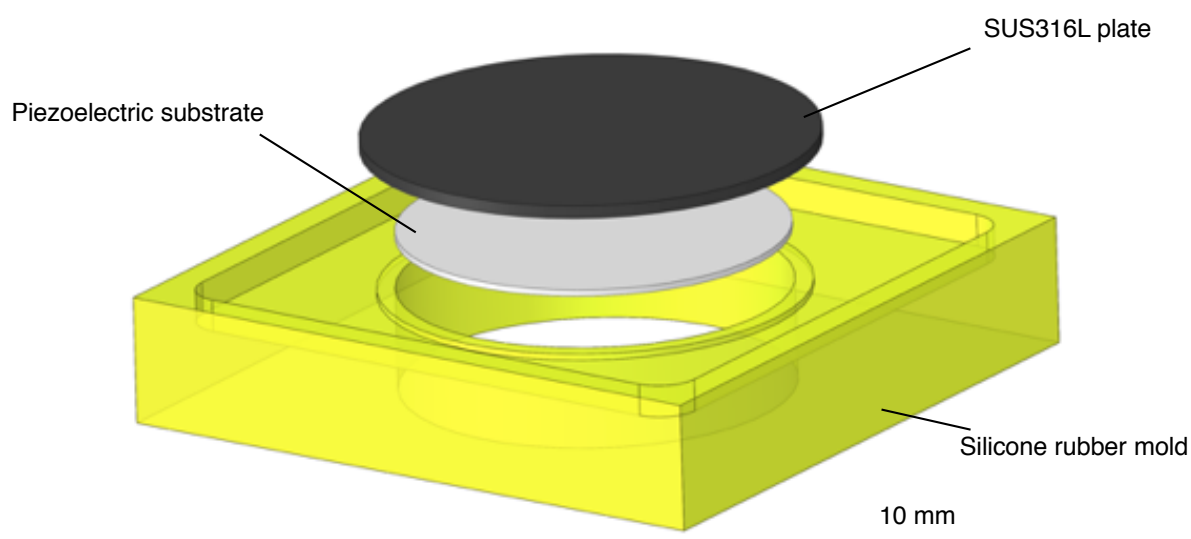


Figure 3-13. Schematic image showing how to use the silicone rubber mold

3.4.1 固有振動数の測定

本項では、振動子に円型の節を1つ有する固有振動を励振した際の周波数特性を明らかにする。Figure 3-6 に示した圧電-構造連成解析の結果を参考にし、圧電素子に交流電圧を印加し、印加電圧の周波数を変化させながら、振動の腹である振動子中央の振動振幅を測定した。なお、細胞をパターンニングする際はチャンバ内にグリセリンを2 mL 配置し、その上に培地 50 μm を入れた状態の細胞培養用ディッシュを配置する。このため、以降の測定では、この状態で振動子を励振した。入力電圧を 40 V として、印加する交流電圧の周波数を 7.0 kHz から 8.0 kHz まで 0.1 kHz ごとに変化させて測定した際の振動子の振動振幅を Figure 3-15 に示す。なお、振幅は最大振幅で正規化している。同図から、円型の節を1つ有する固有振動モードの

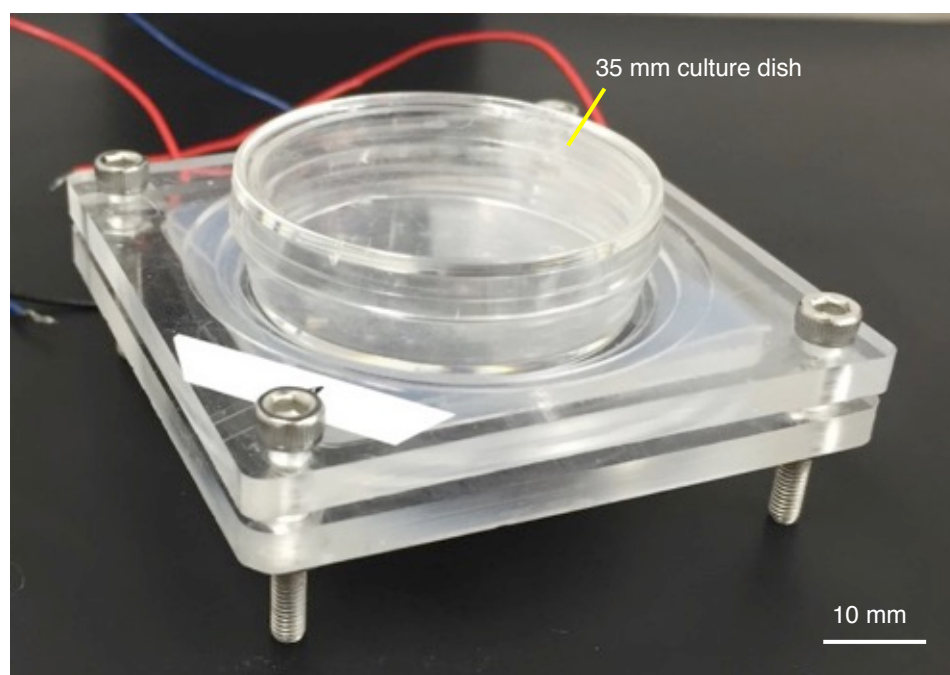


Figure 3-14. Fabricated cell patterning device using ubiquitous culture dish

固有振動数は 7.7 kHz であることが明らかになった。

3.4.2 入力電圧と最大振幅の関係の測定

本項では円型の節を 1 つ有する固有振動を励振した際、圧電素子に印加する電圧と振動子中央部分すなわち振動の腹での最大振幅との関係を明らかにする。すなわち、印加電圧の周波数を固有振動数である 7.7 kHz とし、電圧を 20 V~100 V の間で 20 V ごとに変化させて振幅を測定した。Figure 3-16 に測定結果を示す。同図において横軸は圧電素子への入力電圧を表し、縦軸は最大振幅を表している。同図より、印加電圧と最大振幅には比例関係があるこ

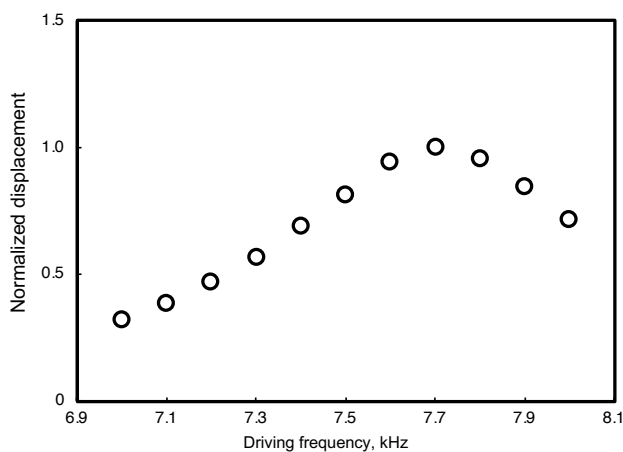


Figure 3-15. Relationship between driving frequency and normalized vibration displacement (voltage, 40 V). The displacement was in the out-of-plane direction and normalized to the maximum value at resonance.

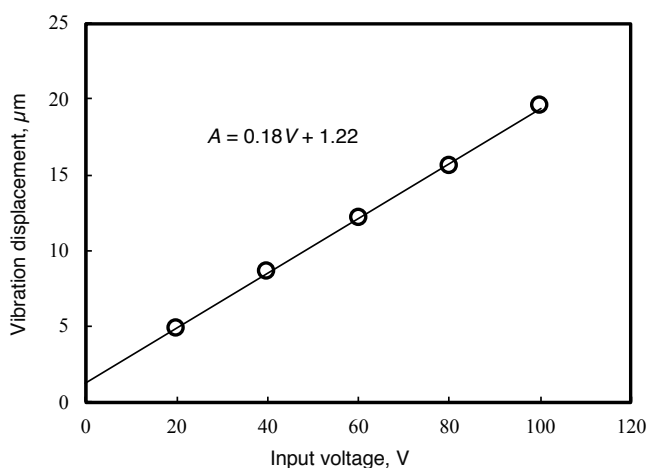


Figure 3-16. The relationships between input voltage and vibration displacement .

とがわかる。なお、印加電圧 V (V) と最大振幅 A (μm) の関係は

$$A = 0.18V + 1.22 \quad (3.5)$$

となった。この式から所望の最大振幅を持つ固有振動を励振する際に必要な印加電圧を決定できる。

さらに、圧電素子への印加電圧に対する最大振幅と、センサ相からの圧電効果による出力電圧との関係をあらかじめ求めておけば、センサ相からの出力電圧により円型の節を持つ固有振動の最大振幅を測定できる。これにより、レーザドップラ振動計の設置が困難であるインキュベータ内での細胞パターンニング実験の際も、常に振動の振幅を確認することができる。キャリブレーションの結果を Figure 3-17 に示す。同図において横軸はセンサ相の出力電圧を表し、縦軸は最大振幅を表している。同図より、出力電圧と最大振幅には比例関係がある。なお、センサ相からの出力電圧 V (V) と最大振幅 A (μm) の関係は

$$A = 0.58V + 1.50 \quad (3.6)$$

となった。

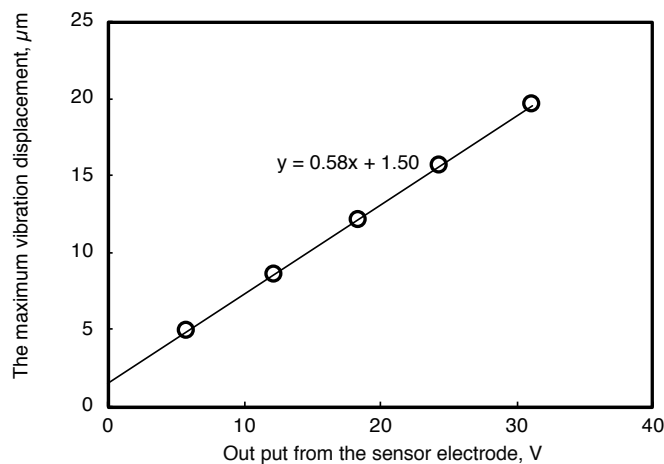


Figure 3-17. The relationship between the output from the sensor electrode and the maximum vibration displacement.

3.4.3 振幅分布の測定

本項では円型の節を1つ有する固有振動を励振した際の振動子の振幅分布を明らかにする。印加電圧を40 V、周波数を前項で測定した固有振動数である7.7 kHzとして振動子に円型の節を1つ有する固有振動を励振し、振動子の中心より3 mm間隔でFigure 3-18に示す直線上において、3 mm毎に振動子表面の振幅を測定した。Figure 3-19に振幅分布の測定結果と3.2節で行った圧電-構造連成解析の結果との比較を示す。なお、振幅は、振動子中央で測定した最大振幅で正規化している。同図より、圧電-構造連成解析および測定の結果ともに振動子の中心が最大振幅となることがわかる。また、圧電-構造連成解析および測定の結果ともに中心から12 mm以上離れた位置での振動の位相が中心での振動の位相に対して逆位相であることから、円型の節を1つ有する固有振動モードが励振されていることがわかる。なお、振動の位相を確認する際は、入力電圧とレーザドップラ振動計で測定した振動速度の波形をオシロスコープで表示して判断した。

以上のことから、製作した細胞パターンングデバイスの振動子には所望の固有振動、すなわち円型の節を1つ有する固有振動が励振されていることが確認された。

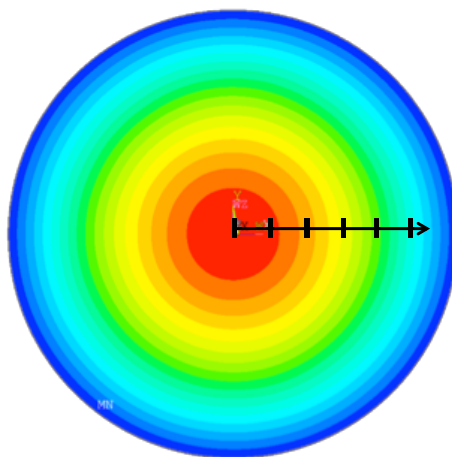


Figure 3-18. Positions where vibration displacements were measured at every 3 mm with single nodal circle

3.4.4 培地温度の測定

超音波振動を媒質中に照射すると、媒質中を伝播するにつれて減衰が発生する。この減衰は、主に散乱減衰、拡散減衰、吸収減衰に大別される¹³³。散乱減衰は振動が媒質中に存在する障害物を中心に四方八方に散乱することで発生する。拡散減衰は振動の広がりによるエネルギーの拡散のことである。最後に、吸収減衰は振動が媒質に吸収されて発生する減衰で、吸収された運動エネルギーは熱エネルギーに変換される。この過程で振動が伝播する媒質の温度が上昇する。ここで、細胞を培養する際は36-38°Cが適温とされている¹⁴⁹。そこで、温度プローブ（TR-71wf, T&D Corporation）を用いて、培地内の温度の変化を計測した。細胞パターンニング実験では、5, 10, および15 μm の最大振幅を有する固有振動モードを10分間励振することで細胞のパターンニングを行うため、これらの条件において温度の変化を測定した。すなわち、培地量、振動振幅、振動数および振動照射時間を細胞パターンニング実験の際と同じ条件で行なった。なお、これらの実験は細胞パターンニングデバイスをインキュベータに配

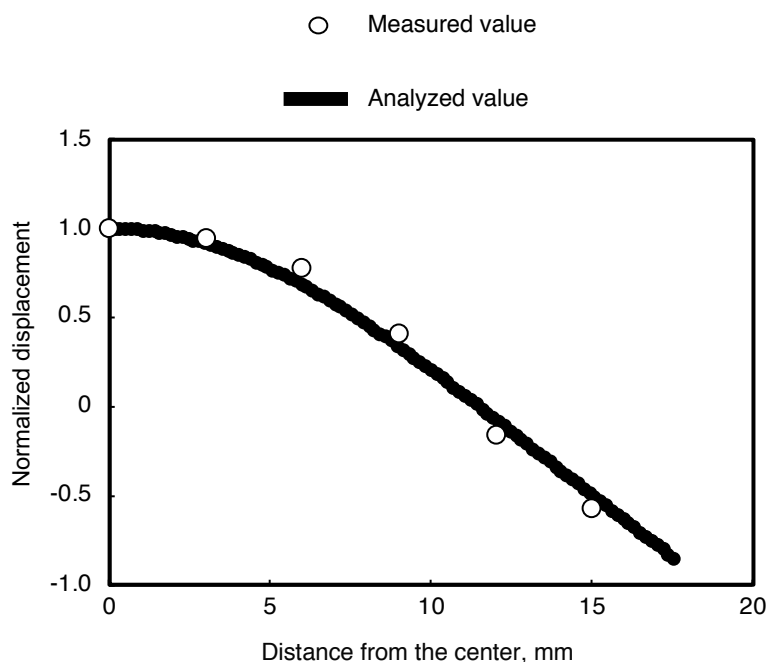


Figure 3-19. Comparison of measured and analyzed vibration displacement of the resonance vibration.

置して行った。温度の測定結果を Figure 3-20 に示す。同図から、いずれの条件においても培地の温度が 38°C を超えることはないことが確認された。このため、これらの条件で細胞のパターンニング実験を行うこととした。

3.5 汎用培養ディッシュ内における超音波を用いた細胞パターンニング実験の方法

本節では、本章のコンセプトを確認するため、前節までに製作し、特性を評価した細胞パターンニングデバイスを用いた細胞パターンニング実験の方法について記す。なお、本章では、細胞の接着位置を制御するだけではなく、最大で 120 時間の培養を行ない、超音波照射が細胞に与える影響についても評価する。また、以降では基本的に円型の節を 1 つ有する固有振動モードを用いて手法のコンセプトを確認し、最後に円型と直線型の節を併せ持つ固有振動モードを用いて細胞のパターンニングを行い、手法の汎用性を確認する。

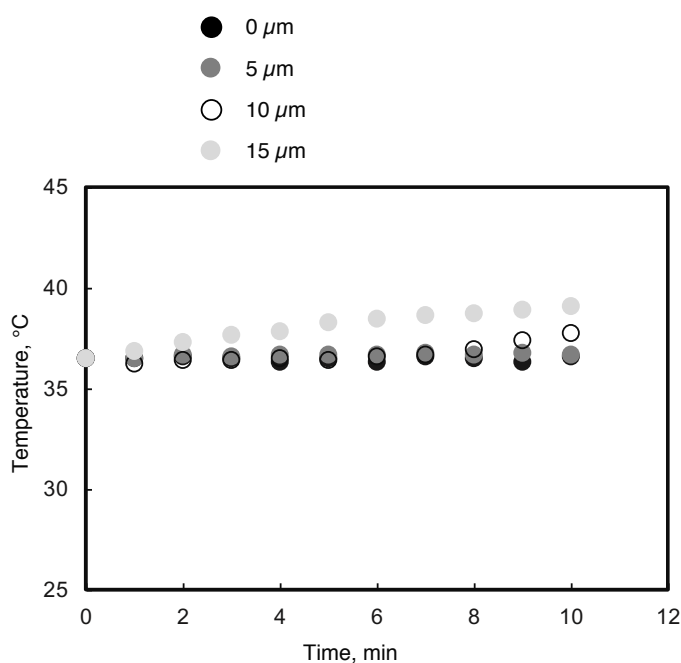


Figure 3-20. Temperature variation of the medium during cell patterning with each vibration amplitude.

3.5.1 細胞の準備

本研究の強みであり、最大の特徴は、化学物質等を用いずに細胞をパターンニングすることによって細胞の活性に影響を与えずにパターンニングを行うことである。そこで、本実験では、細胞に対して影響を与えずに所望の形状にパターンニングを行うことを目的としている。しかし、超音波振動が細胞の機能性を変化させる恐れがある。そこで、振動刺激によって機能性が変化すると報告されているマウス由来筋芽細胞株 C2C12 を、あえて用いて実験を行い、超音波照射後の細胞の機能性を評価することで、本手法が細胞の機能性に影響を与えるか否かを評価する^{115,150}。なお、この細胞株は理化学研究所のセルバンクから購入したものであり、バイオエンジニアリング分野の研究で一般的に用いられている細胞の1つである。

また、細胞を培養するための培地には、増殖用培地として、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 の培養に適した Ham-F12 に FBS を 10 % 加えたものを用いた。継代は、PBS で培養面を 2 回洗浄し、細胞剥離は 0.05 % トリプシンに 3 分間浸漬し、ピペッティングにより回収することで行った。なお、継代操作に用いる薬品は、恒温槽を用いて細胞培養用インキュベータと同じ温度である 37°C とし、培養は細胞培養用のインキュベータの中で行った。

また、培養中の C2C12 は細胞密度が細胞の機能に大きく影響を与えることが知られている。具体的には、播種密度が低すぎると増殖性が大きく低下し、細胞同士が接触するコンタクトインヒビション（接触障害）が発生すると、分化誘導が開始される¹⁵¹。このため、播種する際は 1/10 コンフルエントになるように細胞数を調整し、コンタクトインヒビション（接触障害）を避けるため、2-3 日毎に継代を行った。

十分に増殖し、安定した細胞は、以下の方法で凍結保存した。継代培養と同様の方法で細胞を回収し、遠心分離した。上澄を取り除き、細胞 1.0×10^6 個あたり、冷凍保存液（CELL BANKER 1, ZENOAQ）を 1 mL 加えた。十分にピペッティングして混和し、クライオチューブに 1 mL ずつ分注した。クライオチューブをウエスで包み、これをさらにアルミホイルで包んだ状態で -80°C のディープフリーザに 24 時間静置して凍結させた。最後にこれを液体窒素が入った細胞凍結保存容器に移して -196°C で保存した。

以上の手順で準備した細胞を用いて以降の実験を行った。なお、実験を行う際は、以下の手順で融解した細胞を十分に継代培養したものを用いた。凍結した細胞が入ったクライオチューブを恒温槽に入れて迅速に融解した。融解した細胞懸濁液に対して増殖用培地 10 mL を加えて、2 度遠心分離を行った。上澄を除去し、適量の増殖用培地を加え懸濁し、常法にて培養した。

3.5.2 細胞パターンニングの際の実験手順

設計、製作および評価した細胞パターンニングデバイスを用いた細胞パターンニング実験の際の手順を以下に示す。継代培養と同様の手法により細胞を回収し、この細胞懸濁液を細胞数 $4.0 \times 10^6/\text{mL}$ となるように増殖用培地を用いて濃度を調整し、 $\phi 35$ 細胞培養用ディッシュに $50 \mu\text{L}$ 播種した。すなわち、細胞数 2.0×10^5 を播種した。なお、この細胞培養用ディッシュは事前に増殖用培地を用いて全体を湿らせており、細胞懸濁液が容易に培養面全体に行き渡る。細胞を播種した細胞培養用ディッシュを細胞パターンニングデバイスに設置し、細胞培養用インキュベータ内で 10 分間振動を励振した。10 分後、細胞培養用ディッシュを細胞パターンニングデバイスから取り出し、 $500 \mu\text{L}$ の増殖用培地を用いて培養面を 2 度洗浄した。続いて、 1 mL の増殖用培地を加えて細胞培養用インキュベータ内で静置培養した。

なお、2 章の研究結果から振動を用いた細胞パターンニングの際は、付与する振動振幅がパターンニングの形状に影響を与えることが明らかになっているため、振動数を 7.7 kHz として、 $5 \mu\text{m}$ 、 $10 \mu\text{m}$ 、 $15 \mu\text{m}$ の最大振幅を持つ固有振動を振動子に励振して細胞パターンニング実験を行った。

3.5.3 細胞パターンニングの評価

細胞パターンニングの結果を評価するため、生細胞を染色し、ディッシュ全体の蛍光写真を取得した。生細胞の染色には Calcein AM (1 mg/mL) を用いた。染色の際は、2.5.3 項と同様の手法で行なった。ただし、10 分間のパターンニング直後に染色の操作をすることで、播種直後の細胞が剥離する可能性があるため、細胞が培養面に対して十分に接着した後に染色を行なった。具体的には、パターンニング後にインキュベータ内で 6 時間培養した後に染色を行なった。細胞培養用ディッシュ全体を撮影するために倒立型蛍光顕微鏡 (Nikon eclips Ti-s, 株式会社ニコン) を用いて蛍光写真を取得した。この際、複数視野の画像を撮影した後につなぎ合わせる機能であるラージイメージ機能を用いて、細胞培養用ディッシュ全体の蛍光写真を取得した。さらに、細胞パターンニングの結果を定量的に示すために、Figure 3-21 に示すように image J を用いて培養面の中心から 3 mm ごとに、一辺が 3 mm の正方形内の細胞接着面積を測定した。ここから、一片が 3 mm の正方形の中で細胞が占める面積を算出した。

3.5.4 増殖性の評価

生成した組織の活性を評価するため、パターンニングされた細胞の増殖性を測定した。具体

的には、パターンニング後、6, 24, 72, 120 時間後の細胞数を測定した。なお、パターンニング後 24 時間培養した以降は、増殖用培地ではなく、分化誘導培地を用いて実験を行なった。分化誘導用培地とは、マウス由来筋芽細胞株の分化誘導に用いられる、Horse Serum (HS)を2%加えた Ham-F12 のことである¹⁵²。また、24 時間ごとに分化誘導用培地を用いて培地交換を行なった。この培養方法は以降の評価の際にも共通して行った。細胞数の測定には、血球計算盤を用いた。細胞を剥離する際は、PBS を用いて細胞培養用ディッシュ内を2度洗浄し、0.05%トリプシンに3分間細胞を浸漬させ、その後、細胞培養用ディッシュ内に残存した細胞を PBS によって回収した。

3.5.5 細胞の3次元構造の確認

パターンニングされた細胞を120時間培養した際の3次元構造を評価した。具体的には共焦点顕微鏡により、細胞骨格(アクチン)と細胞核の蛍光写真を取得し、断面の写真を取得した。アクチンと細胞核を染色するため、それぞれ Cellstain® Hoechst 33342 solution (H342, 同仁科学研究所) とローダミンファロイジンコンジュゲート (R-415, Invitrogen) を用いて免疫蛍光染色を施した。以下に染色の方法述べる¹⁵³。

播種後、120時間培養した細胞培養用ディッシュから培地を除去し、3度 PBS で洗浄した。2.5%グルタルアルデヒド PBS 溶液 (Glutaraldehyde Solution, 和光純薬工業) を添加して、室温で20分インキュベートした。3度 PBS で洗浄した後に、0.1% Triton X-100 PBS 溶液 (Triton® X-100, 和光純薬工業) を添加して15分間室温でインキュベートした。その後、3度 PBS で

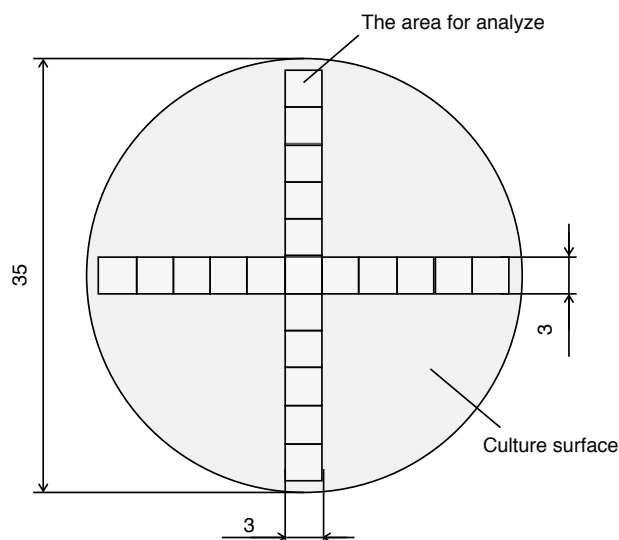


Figure 3-21. Schematic image showing how to measure cell distribution.

洗浄し, BSA-PBST を添加して 30 分間室温でインキュベートした. なお, BSA-PBST は PBS に対して, Bovine serum albumin (A9418, Sigma-Aldrich), Tween20 (P7949, Sigma-Aldrich), アジ化ナトリウム (S8032, Sigma-Aldrich) をそれぞれ 1.0%, 0.1%, 0.02% 含んだものである¹⁵⁴. 最後に, Cellstain® Hoechst 33342 solution とローダミンファロイジンコンジュゲートを 400 μL の BSA-PBST に対して, それぞれ 2 μL 溶解したものを添加して 1 時間室温でインキュベートした.

上記の手法で細胞組織を染色し, 振動子に励振した固有振動の節の上部である, 培養面中心から 12 mm 離れた位置において, 共焦点顕微鏡 (Zeiss LSM 700 Confocal, Oberkochen) を用いてパターンニングされた細胞の断面の写真を取得した.

3.5.6 タンパク質の定量

本章では, 超音波振動を用いて, 細胞に害を与えずにパターンニングする手法を確立することが目標である. そこで, 超音波振動が細胞の内部および表面に存在するタンパク質にあたる影響を評価するため, タンパク質の定量評価手法の 1 つであるウェスタンブロッティング (Western Blotting: WB) によってタンパク質発現を評価した. WB は, 細胞の機能性を評価する際に一般に用いられている手法であり, ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を行った後に, 分離されたタンパク質をメンブレンに転写し, 抗体を用いて特定のタンパク質を検出する. 本手法における超音波振動の安全性を示すためにパターンニング後 120 時間培養した細胞に対して評価を行なった. 本章で細胞パターンニングのコンセプトを示すために用いた細胞であるマウス由来筋芽細胞株 C2C12 は振動によって, その分化誘導率が変化するという報告があるため, C2C12 が分化誘導された際に生成されるタンパク質である, Myosin Heavy Chain (MHC), および文化誘導の際に重要な役割を担う, Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) の発現量を評価した^{155,156}. なお, これらのタンパク質はそれぞれ細胞質と細胞膜に存在する.

さらに, WB の実験においては, 結果の妥当性の根拠として, 発現量が一定で安定しているタンパク質をローディングコントロールとして使用する必要がある. 本研究では, 代表的なローディングコントロールとしてハウスキーピング遺伝子である β -アクチンを用いた³⁴. なお, β -アクチンの定量には, 一次抗体として Anti-mouse (rabbit) β -actin polyclonal antibody (#4967; Cell signaling technology), 二次抗体として Anti-Rabbit IgG (goat) HRP labeled (NEF812001EA, perkinelmer) を用いた. また, MHC の検出のために, 一次抗体として Anti-Myosin, Heavy Chain, Mouse-Mono(MF20) (MAB4470, R & D,), 二次抗体として Anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat (A4416-1 mL, sigma) を, LIFR の検出のために一次抗体として Anti LIFR, Human (Rabbit) (22779-1-AP, Proteintech), 二次抗体

として Anti-Rabbit IgG (goat) HRP labeled (NEF812001EA, perkinelmer) を用いた。

3.6 汎用培養ディッシュ内における超音波を用いた細胞パターンニング実験の結果および考察

本節ではパターンニングの結果を評価し、本章の手法において細胞パターンニングに至適な振幅を求めた。さらに、パターンニング後の細胞の活性を増殖性、3次元構造、およびタンパク質発現の観点から評価した。

3.6.1 振動振幅とパターンニングの関係

それぞれの最大振幅を用いて細胞パターンニングを行い、パターンニングした細胞を6時間後に染色した蛍光写真を Figure 3-22 に示す。同図から、定性的ではあるが、最大振幅 $10\ \mu\text{m}$ の固有振動を励振した際に細胞が円環状に、すなわち振動の節の形状にパターンニングされていることが伺える。一方で、最大振幅 $15\ \mu\text{m}$ の固有振動を励振した際には $10\ \mu\text{m}$ の振動を励振した際と比較して綺麗な円環状にパターンニングされていないことがわかる。この結果を定量的に評価するため、3.5.3 項で述べた方法で細胞分布を測定した。細胞分布と振動分布の比較を Figure 3-23 に示す。さらに、振幅の大きさと細胞密度の関係を明示するため、 x 軸を振幅、 y 軸を細胞密度としたグラフを Figure 3-24 に示す。ここで、2章において、固有振動を用いて細胞をパターンニングする際は振幅と細胞密度の関係が一次関数で表すことが可能で、細胞が接着する閾値となる振幅が存在した。Figure 2-24 から最大振幅 $10\ \mu\text{m}$ の振動を用いた際には、振動振幅 A と細胞密度 D の関係は

$$D = -0.056A + 0.34 \quad (3.7)$$

のように表されることが明らかになった。さらに、本パターンニング手法において、細胞が接着するための振幅の閾値はおおよそ $7\ \mu\text{m}$ であることもわかった。このことから、本パターンニングのコンセプトの妥当性、および最大振幅 $10\ \mu\text{m}$ が本パターンニングにおける至適な振幅であることが明らかになった。

より大きな振幅を持つ振動を励振した際に細胞のパターンニングが実行できなかったこと、すなわち、振幅に至適な値が存在することは振動により発生する音響流に起因すると考えられる⁷⁴。

さらに、振動を用いない場合（コントロール）と最大振幅 $10\ \mu\text{m}$ の固有振動を用いた場合に長期培養を行い、24時間後、72時間後、120時間後に生細胞を染色し、培養面全体の蛍光写真を取得した。撮影した蛍光写真を Figure 3-25 に示す。同図から、パターンニングされた細胞はその形状を保ちつつ、120時間培養後も生存していることがわかる。

以降の実験ではパターニングに至適な条件である最大振幅 $10\ \mu\text{m}$ の固有振動を用いて、超音波の細胞に対する影響を確認する。

3.6.2 増殖性

上記で述べたように、コントロールと最大振幅 $10\ \mu\text{m}$ の固有振動によってパターニングした細胞を長期培養し、増殖性を確認した。この結果を Figure 3-26 に示す。細胞パターニングの直後である6時間後から72時間後まではパターニングされた細胞数が有意に少ない。このことは振動によって細胞の初期接着が阻害されたことを意味している。一方で、この差は120

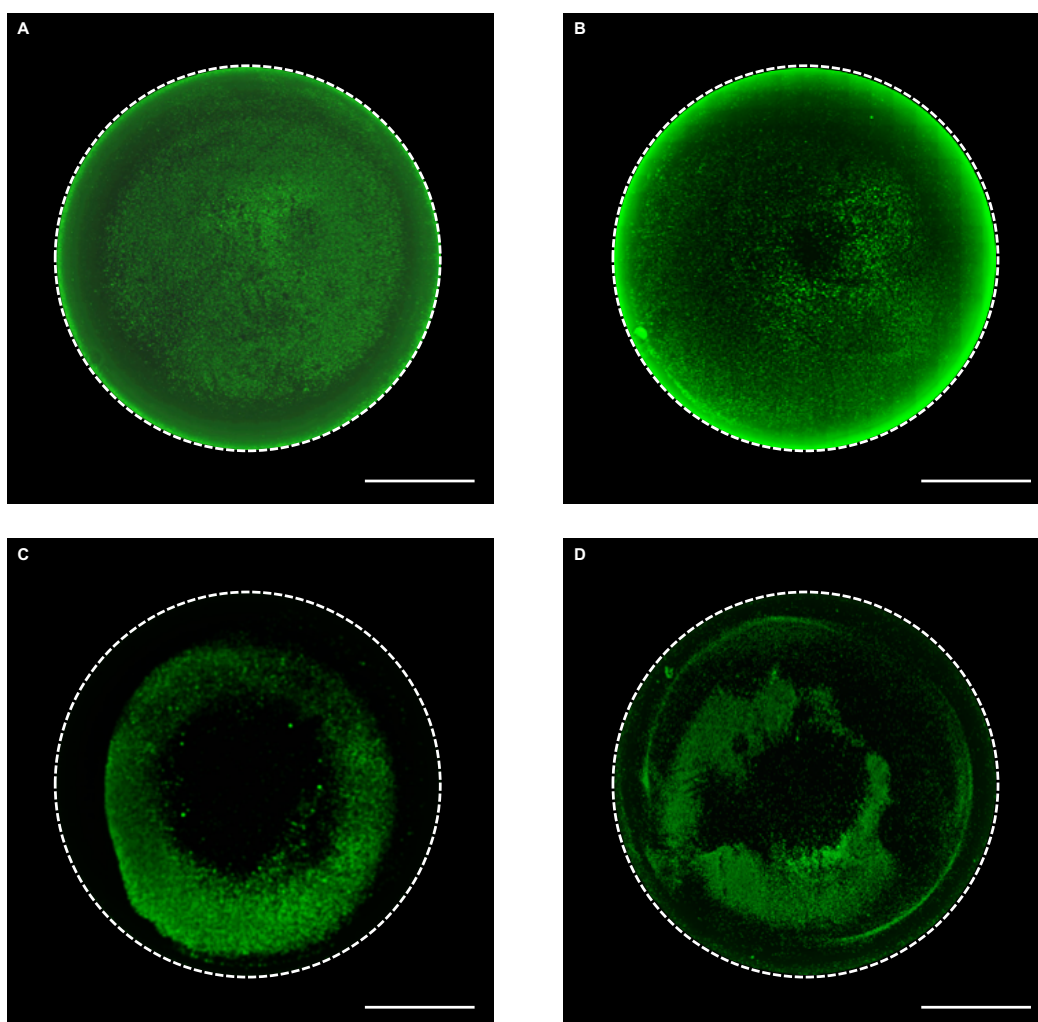


Figure 3-22. Fluorescent images of the cell patterning results with **A**: the control or a maximum amplitude of **B**: $5\ \mu\text{m}_{\text{p-p}}$, **C**: $10\ \mu\text{m}_{\text{p-p}}$, and **D**: $15\ \mu\text{m}_{\text{p-p}}$. The number of seeded cells was 2.0×10^5 and patterned cells were cultured for 6 h. Live cells were dyed with Calcein-AM. The broken line shows the edge of the dish. Scale bar shows $10\ \mu\text{m}$.

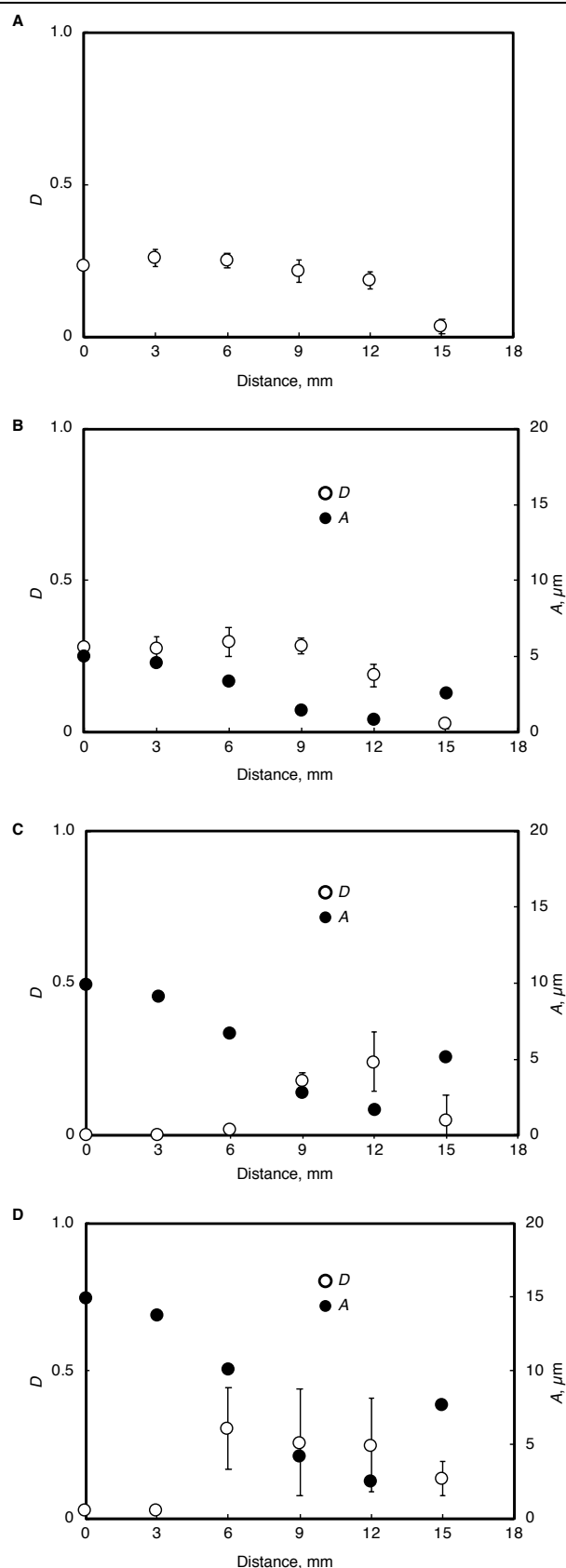


Figure 3-23. Cell patterning results of the control cells (A) and cells with a maximum amplitude of 5 μm (B), 10 μm (C), and 15 μm (d) (mean \pm SD, $n = 4$). Comparison of the amplitude distribution and the cell distribution. The number of seeded cells was 2.0×10^5 and seeded cells were cultured for 6 h. The ratio of the area of live cells to the area of the entire square was calculated as cell density.

時間培養後には無くなっている. このことから, 超音波による細胞の増殖性の低下は引きここされていないことが明らかになった. しかし, 120 時間後の細胞数に差がないにも関わらず, Figure 3-25 に示すように細胞の接着面積には明らかに差がある. そこで, 次項において細胞の3次元方向の積層を確認した.

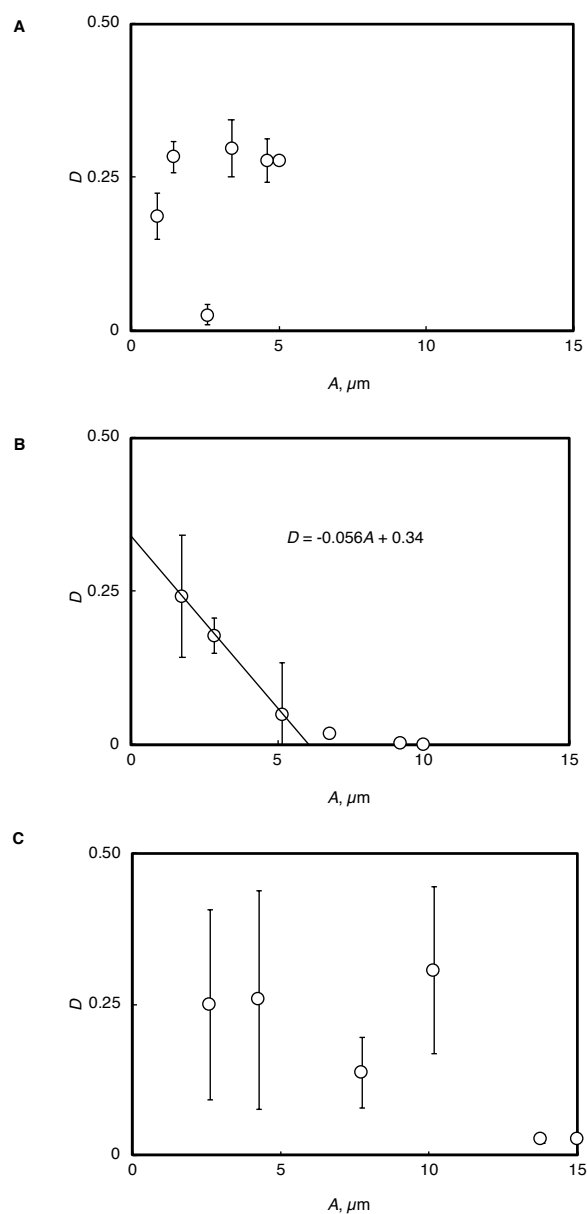


Figure 3-24. Cell patterning results of cells with a maximum amplitude of 5 μm (A), 10 μm (B), and 15 μm (C) (mean \pm SD, $n = 4$). Relationship between the vibration amplitude, A , and the cell density. D . The number of seeded cells was 2.0×10^5 and patterned cells were cultured for 6 h. The ratio of the area of live cells to the area of the entire square was calculated as cell density.

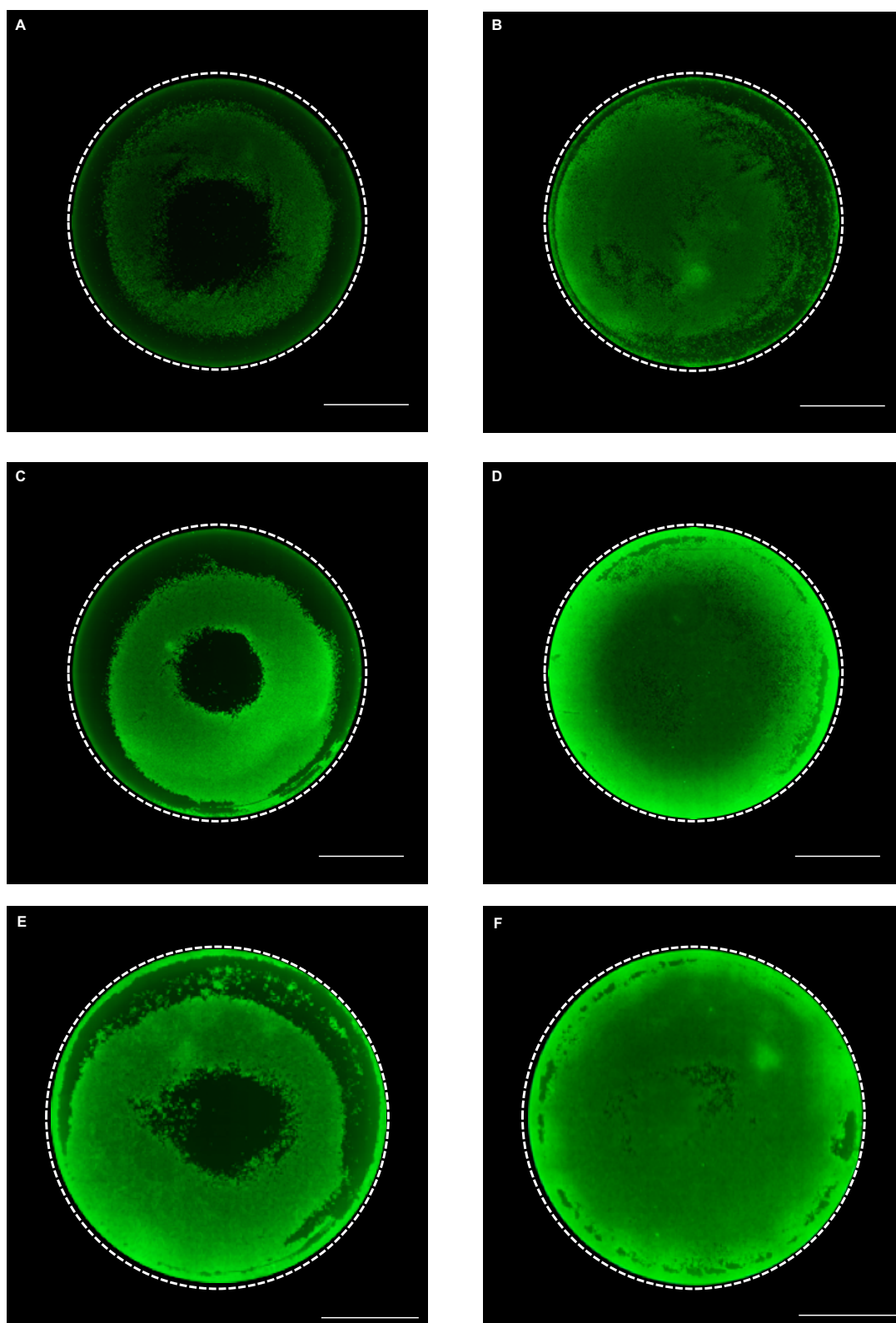


Figure 3-25. Fluorescent images of the samples after cell patterning with (A, C, E) a maximum amplitude of 10 μm and (B, D, F) control. Samples were cultured for 24 h (A, B), 72 h (C, D), and 120 h (E, F). Live cells were dyed with Calcein-AM. Scale bars indicate 10 mm. Broken lines show the edges of the dish.

3.6.3 3次元方向への積層

パターニングされた細胞とコントロールの細胞を120時間培養し、アクチンと核を染色し、3次元方向の断面の蛍光写真を撮影した。Figure 3-27 にそれぞれの条件における断面の写真を示す。同図から、パターニングされた細胞は積層しており、コントロールのサンプルと比較して3次元方向に厚いことがわかる。この結果は、細胞数に差がないにも関わらず、細胞の接着面積が異なる、という結果と合致する。

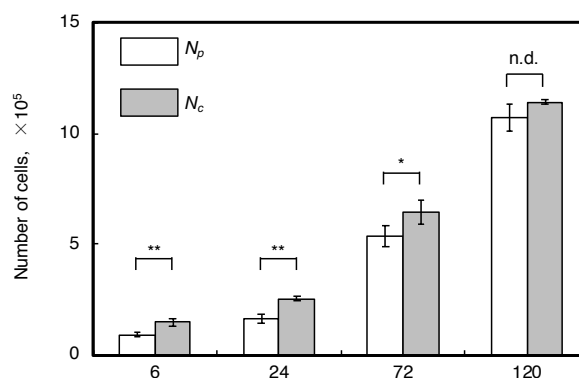
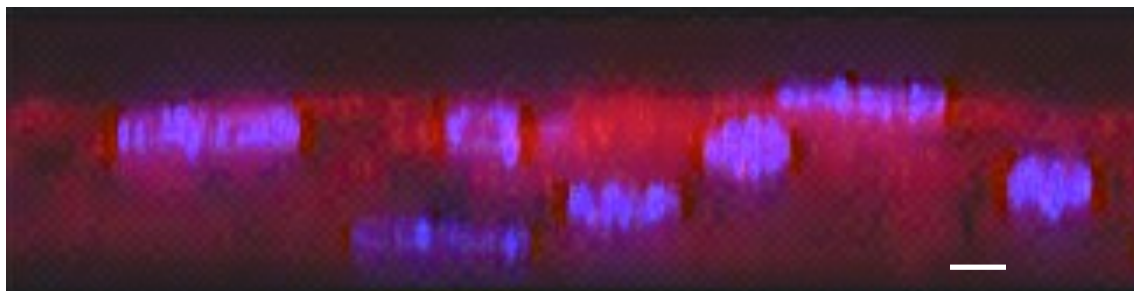


Figure 3-26. Proliferation of the samples (mean \pm SD, $n = 4$, $*p < 0.05$, $**p < 0.01$). N_p : Number of patterned cells. N_c : Number of control cells.

A



B

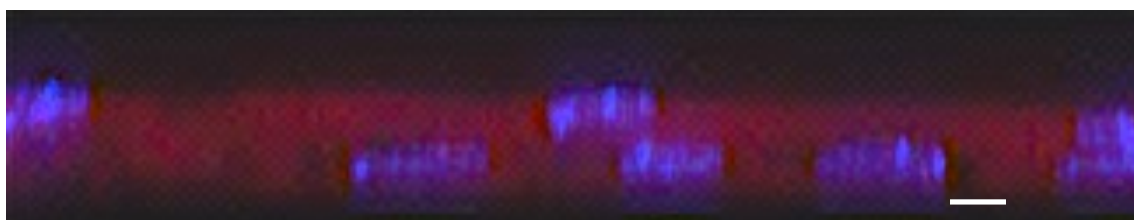


Figure 3-27. Cross section images of patterned (A) and control (B) samples, respectively. Cell nuclei and β -actin were stained with Hoechst333342 (blue) and Rhodamine Phalloidin (red), respectively. Scale bars indicate 10 μm .

この細胞の3次元化に関して原因を考察する。本研究で用いた細胞であるマウス由来筋芽細胞株 C2C12 は細胞内の張力が強い細胞である^{70,157}。例えば、細胞シートを生成すると自己収縮力によって、培養面から剥がれた部位から急激に収縮を開始し、細胞同士が積層する¹⁵⁷。このことから、本実験においても、自己収縮によって細胞が積層したと考えられる。すなわち、コントロールでは、細胞同士が接着しあい、力のバランスが保たれているが、パターンニングされた細胞は培養面の中心と縁、すなわち振動の腹近傍の細胞は他の細胞や壁と接着していないため、振動の節の方向に引き寄せられた可能性がある。本考察の説明を Figure 3-28 に示す。

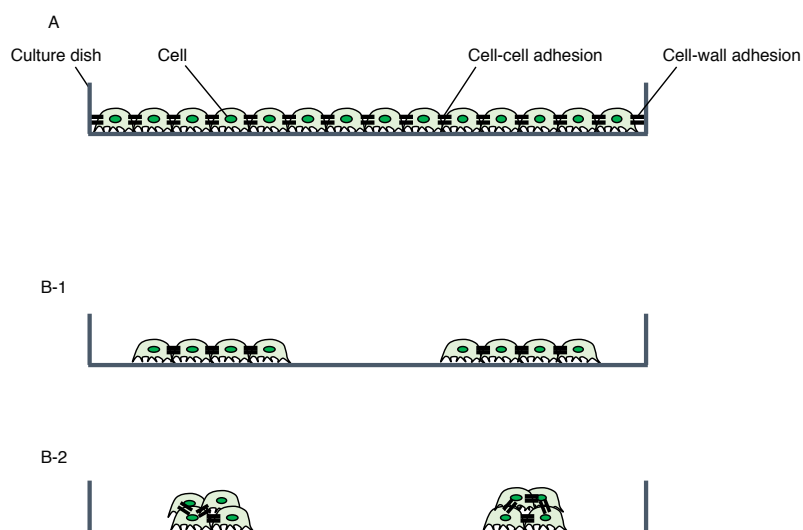


Figure 3-28. Schematic image of the reason why cells were piled up when patterned. (A) Cells making monolayer. (B-1) Patterned cells. (B-2) Shrunken cells.

3.6.4 タンパク質の定量

医療に細胞を用いる際、細胞の生死や増殖性が重要なのは当然だが、細胞の機能性も同様に重要である。実際に、超音波を付与することで、今回の研究に用いた細胞の機能性が変わることが報告されている^{115,150}。この先行研究では細胞の分化率に変化が見られたため、本研究でも分化に関わるタンパク質を細胞質と細胞膜からそれぞれ選択して WB によって定量した。WB の結果を Figure 3-29 に示す。同図から、各タンパク質は妥当な濃度で検出できていることがわかるため、この結果から MHC と LIFR をそれぞれの条件の β -actin で正規化し、コントロールの細胞サンプルから検出されたタンパク量を 1 として定量した (Figure 3-30)。この結果、本研究における細胞パターンニング手法は細胞の分化に影響を及ぼさないことが明らかになった。さらに、それぞれのタンパク質が存在する場所を鑑みると、細胞質と細胞膜に存在するタンパク質のどちらにも影響がないことも明らかになった。

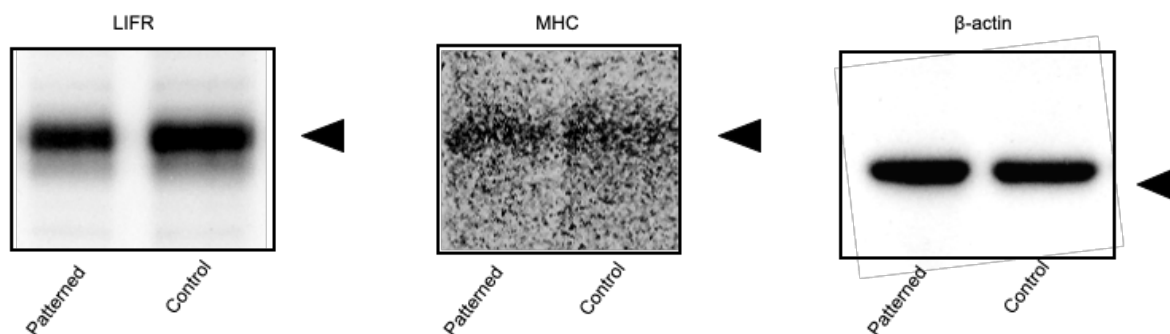


Figure 3-29. Western blot analysis of C2C12 cells. Western blot of patterned and control cells using anti-leukemia inhibitory factor receptor (LIFR, top panel), anti-myosin heavy chain (MHC) (middle panel), and anti- β -actin (bottom panel) antibodies. Arrows indicate the target protein bands.

3.6.5 本手法の汎用性

上記までで、円型の節を1つ有する固有振動モードを用いた際の本パターンニング手法の妥当性を示した。本項では、円型と直線型の節を併せ持つ固有振動モードを用いて、汎用培養ディッシュ内で細胞のパターンニングを行うことで、本手法の汎用性を示す。円型の節を1つ有する固有振動モードを用いた細胞パターンニングを行なった際と同じ手法で振動特性を評価した。この結果、円型の節を1つ有する固有振動モードを励振する固有振動数は17.7 kHzであることが明らかになった。このため、最大振幅4.5 μm 、振動数17.7 kHzの固有振動を用い

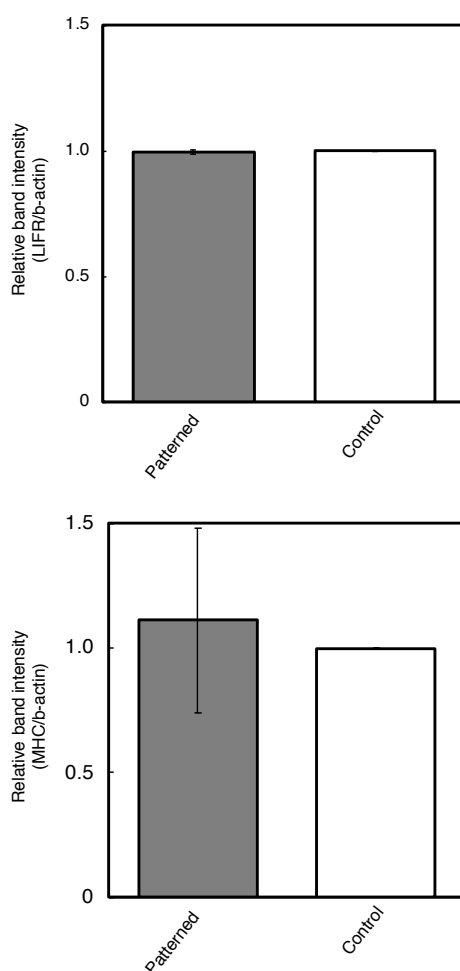


Figure 3-30. Western blot analysis of C2C12 cells. Relative protein quantities of LIFR and MHC were measured using their band densities on western blots. Protein quantities were normalized to the band density of β -actin. The data are expressed as means with standard deviation ($n = 3$).

て、3.5節で述べた手法に従って細胞パターンニングを行なった。その結果、Figure 3-31に示すように固有振動モードに類似した形状に細胞をパターンニングすることができた。この細胞パターンニングの結果を定量的に評価するため、細胞分布を測定した。この際は、Figure 3-32に示すように振動の腹を通る方向に中心から3 mmごとに細胞密度と振動振幅を測定した。測定した振動振幅と細胞分布との関係をFigure 3-33とFigure 3-34に示す。これらの図から、円型と直線型の節を併せ持つ固有振動モードを用いた際もコンセプトの細胞パターンニングが可能であることが示された。このことから、振動子の固有振動モードを用いることで汎用細胞培養ディッシュ内の細胞をパターンニングできることが明らかとなった。

3.7 小括

本章では、汎用的な培養ディッシュ内において振動によって細胞をパターンニングする手法

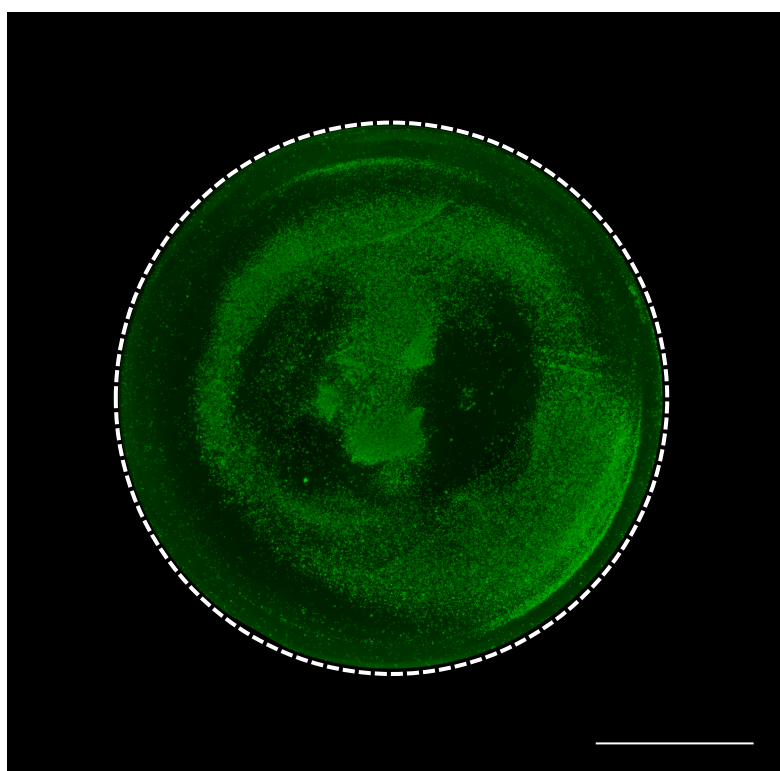


Figure 3-31. Cell patterning results with another resonance vibration mode. The maximum amplitude is $4.5 \mu\text{m}$. Fluorescent images. Live cells were dyed with Calcein-AM. The broken line shows the edge of the dish. The scale bar indicates 10 mm. The number of seeded cells was 2.0×10^5 and patterned cells were cultured for 6 h.

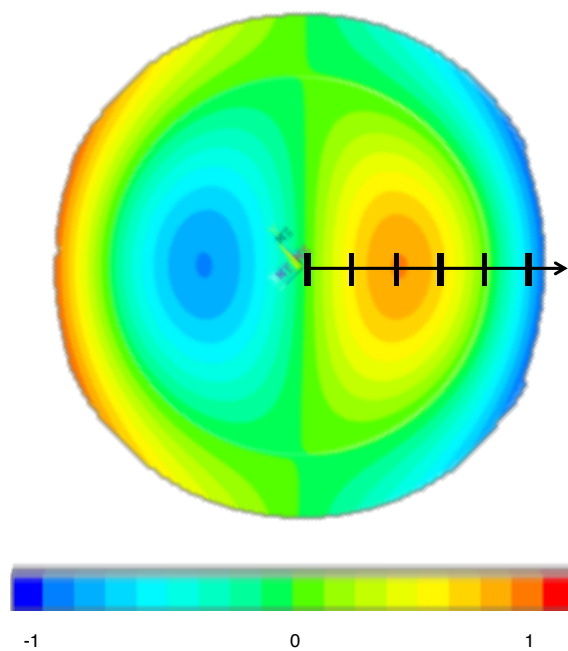


Figure 3-32. Positions where vibration displacements were measured with line-circle node. The colored bar indicates out- of-plane displacement normalized to the maximum displacement.

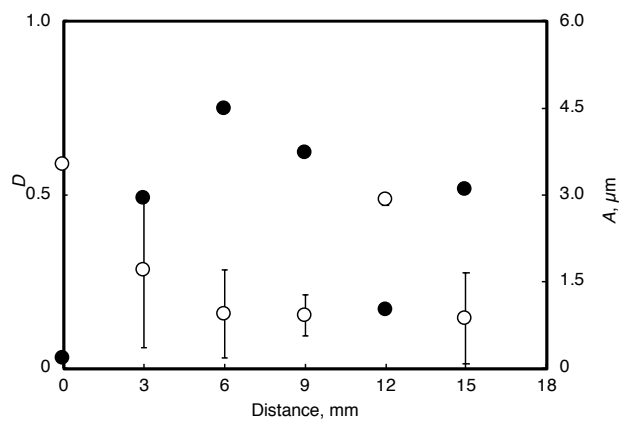


Figure 3-33. Comparison of the amplitude distribution and cell distribution. Note that when evaluating amplitude distribution the input voltage and frequency are 30 V and 17.7 kHz, respectively. the vibration amplitude: A , and the cell density: D . The number of seeded cells was 2.0×10^5 and patterned cells were cultured for 6 h.

を報告した。まず、ディッシュ内に振動を伝播することによって細胞をパターンニングすることを提案 (3.1 節) し、細胞をパターンニングできる振動子 (3.2 節)、およびデバイス (3.3 節) を設計、製作した。円型の節を 1 つ有する固有振動モードを振動子に励振して本研究のコンセプトを確認した。本デバイスの特性を評価 (3.4 節) し、これを用いて 3.5 節で述べた方法に従って細胞のパターンニングを行なった (3.6.1 項)。この結果、振動子に励振された固有振動の振動の節にディッシュ内の細胞をパターンニングすることが可能であることが明らかになった。さらに、細胞の増殖性やタンパク質の発現などを確認することで、本研究で用いた超音波が細胞にとって影響を与えないことを確認した (3.6.2-3.6.4 項)。最後に、上記とは異なる固有振動モードを用いて細胞のパターンニングを行うことで本パターンニング方法の汎用性を示した (3.6.5 項)。以上のように、汎用培養ディッシュ内において、振動を用いることで、いかなる化学物質をも用いることなく細胞をパターンニングする方法を具現化した。

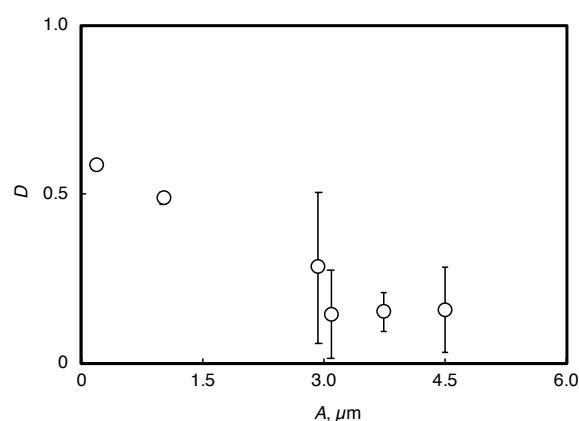


Figure 3-34. Relationship between the vibration amplitude, A , and the cell density, D . The number of seeded cells was 2.0×10^5 and patterned cells were cultured for 6 h.

超音波による汎用培養容器からの 細胞シートの剥離

2章において、固有振動を用いた細胞のパターニングのコンセプトを確認し、3章においてこの技術を汎用的な細胞培養ディッシュ内における細胞パターニングに拡張した。これらの研究を通じて、kHz帯の超音波によって細胞をマニピュレートできることを確認し、ディッシュ内の細胞に所望の振動を伝播する方法を確立した。本章では、前章までの技術を応用して、汎用的な培養容器から細胞シートを剥離する手法を確立する。

4.1 コンセプト

本章では、超音波を用いることで汎用的な細胞培養容器から細胞シートを剥離する手法を確立する。

培養面上でコンフルエントに培養された細胞の細胞同士の接着を壊すことなく、細胞と培養面との接着を切断することで細胞はシート状に剥離される。本博士論文の2章および3章を通じて、下方から伝播する超音波によって細胞と培養面との接着を制御できることを明らかにした。また、細胞の接着を制御するために十分な出力の超音波を照射した際も、細胞はその活性を変化させないことを確認した。ここで、Kurashina *et al.*は金属製の培養面に接着した細胞に対して、下方から超音波を照射することで、接着した細胞の剥離を促進できることを報告している¹⁵⁸⁻¹⁶⁰。具体的には、タンパク質分解酵素のトリプシンやコラゲナーゼに浸漬した細胞に対して、超音波を照射することで細胞の剥離率を向上できること、低温環境下で培養して接着を弱めた細胞に対して超音波を照射することで一部の細胞が剥離することな

どを報告した。これらの研究では、金属製の表面で培養した単一の細胞に対して、下方から超音波を照射することで細胞の剥離率を向上している。すなわち、下方からの超音波の照射は、金属製培養面に接着した細胞を剥離する要因となった。一方で、本博士論文の2章および3章から、超音波が播種直後の細胞の接着を制御する事象は、培養面が金属の場合と汎用ディッシュの場合で同様に観察された。このことから、下方からの超音波の照射が、汎用培養容器に接着した細胞を剥離する要因となると着想した。なお、接着した細胞を超音波のみで剥離した先行研究は報告されていない。

ここで、培養面上でコンフルエントに培養された細胞は、細胞間に張力を発生させ、この張力によって細胞の剥離が促進される場合があることが報告されている¹⁶⁾。このことから、シート状の細胞を剥離する際に必要な外力は、単一の細胞を剥離する際の外力よりも弱い可能性が示唆される。以上のことから、汎用的な細胞培養容器内のコンフルエントな細胞に対して下方から超音波を付与することで、細胞シートを剥離できると着想した。この際に、培養面全体の細胞に均一に超音波を照射することで効率的に細胞シートを剥離できると考え、培養容器の下方から均一な超音波を照射することとした。このコンセプトを示した図がFigure 4-1である。

本章では、細胞シート剥離のコンセプトを確認するために、主に直径35 mmの汎用的な細胞培養ディッシュから細胞シートを剥離する。さらに、その機能性を確認することで本手法

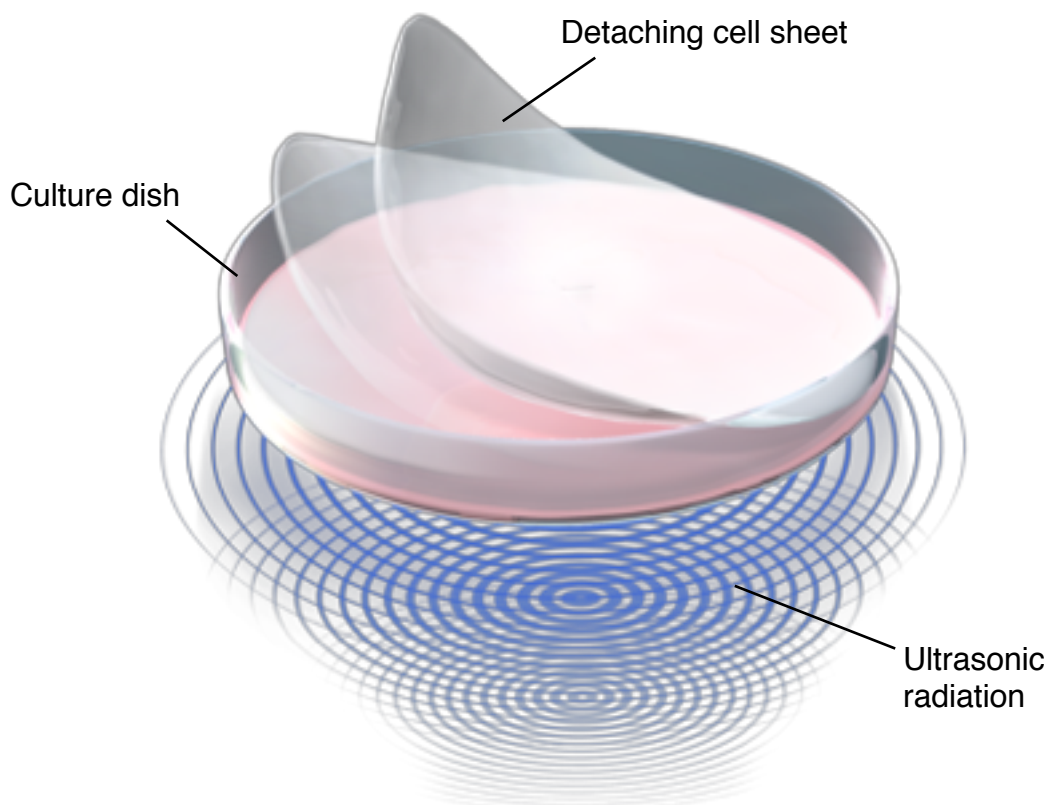


Figure 4-1. Concept of the cell sheet detachment

の実用可能性を評価する。具体的には、本手法で生成した細胞シートの機能を、従来の方法で生成した細胞シートの機能と比較する。ただし、従来の手法とは、現在最も医療応用に用いられている温度応答性ポリマーをコーティングした培養ディッシュ（温度応答性培養ディッシュ）を用いた細胞シートの剥離手法である。また、提案手法の汎用性を示すため、汎用的な細胞培養フラスコからの細胞シートの剥離も実行する。

4.2 細胞シート剥離デバイスの設計と製作

本節では細胞シート剥離のコンセプトを示すため、汎用的な培養ディッシュに対して一様な超音波振動を付与するデバイスを設計、および製作する。汎用的な培養ディッシュには、直径が 35 mm で表面に接着細胞用の処理が施された組織培養用ディッシュ（430165, Corning Inc）を用いることにした。本培養ディッシュを Figure 4-2 に示す。この培養ディッシュの培養面に対して、均一な超音波振動を伝播させるために、ディッシュの下方にランジュバン型振動子を配置して、振動子と培養ディッシュとの間隙をグリセロールで満たした。ランジュバン振動子とは、圧電素子をステンレスなどの固い金属でボルトを用いて締め付けて一体化した振動子のことである。ランジュバン型振動子の縦振動を励振することで、振動子の端面が均一に振動するため、ディッシュの下方から均一な超音波を照射できる。また、この縦振動の振幅は圧電素子単体での厚み振動（Thickness mode）の振幅と比較して大きいことが知

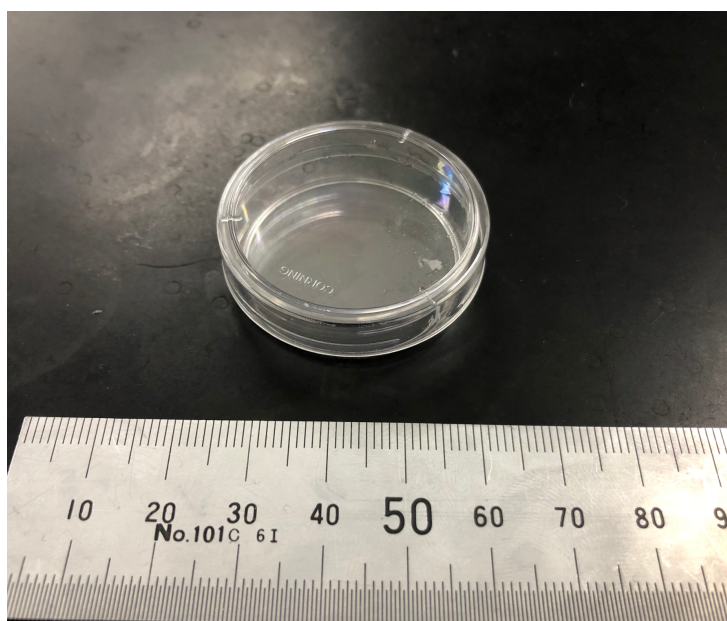


Figure 4-2. Culture dish used in the proposed method.

られている。

直径 35mm の培養ディッシュの底面全体に均一な振動を伝播するために、培養ディッシュよりも大きい振動面を持つ直径 38 mm のランジュバン振動子 (HEC-5020P6BHF JW, 本多電子株式会社) を用いることとした。本振動子を Figure 4-3 に示す。さらに、振動子の振動面上にグリセロールを保持するために、振動面の端にシリコンゴムを焼成してグリセロール用のチャンバを製作した。この際に、Figure 4-4 に示すシリコンゴム成型用の鋳型を製作し、これに対してランジュバン振動子をはめ込み、周囲から焼成前のシリコンゴムを流し込む

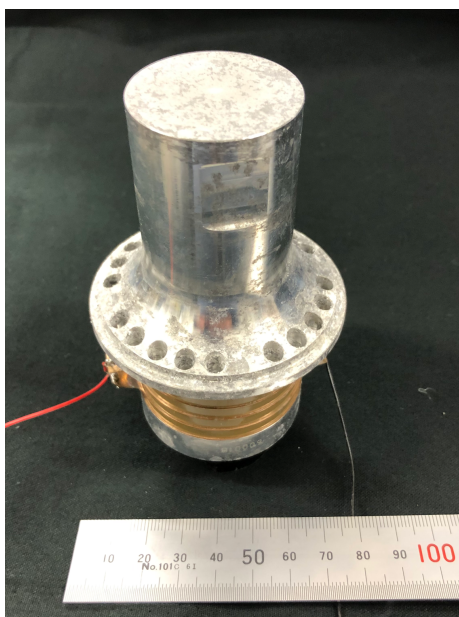


Figure 4-3. Langevin transducer used in the proposed method

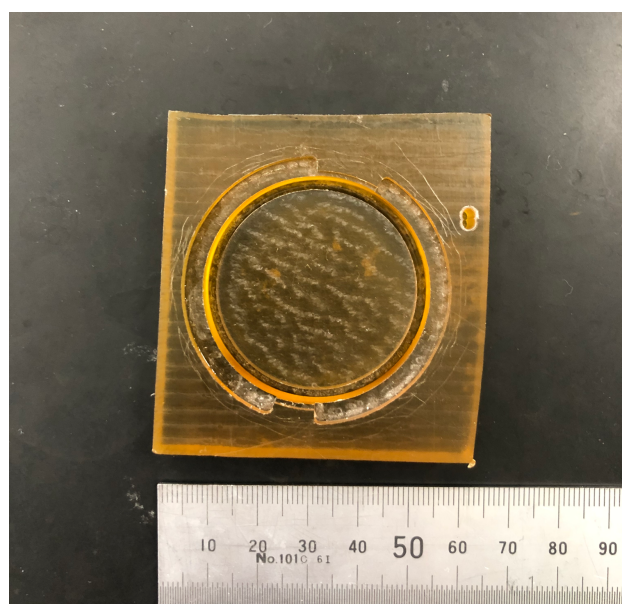


Figure 4-4. The mold for silicone rubber.

ことでグリセロールチャンバを製作した。シリコーンゴムを焼成する際の手順は 3.3.2 項に記したものに従った。すなわち、振動面を鋳型に向けた状態（下方向に向けた状態）で振動子を本鋳型の中央部に配置し、硬化前のシリコーンゴムに、10wt%の硬化剤および 20wt%の希釈剤を混合したシリコーンゴム混合液を流し込んだ。ただし、本操作の前に、あらかじめこの混合液を真空チャンバ内に配置し、脱泡しておいた。さらに、混合液を鋳型に流し込んだ後に、鋳型から溢れた混合液を除去し、再度脱泡した。つづいて、60°C の雰囲気中で 24 時間静置することでシリコーンゴムを焼成した。

最後に、振動子の圧電素子に交流電圧を印加するための導線を半田付けして、細胞シート剥離デバイスを製作した。製作した細胞シート剥離デバイスを Figure 4-5 に示す。

4.3 細胞シート剥離デバイスの評価

本節では、製作した細胞シート剥離デバイスの評価を行う。具体的には、固有振動数、振動子端面の振幅分布、入力電圧と培地温度の関係を測定した。

4.3.1 固有振動数の測定

4.2 節で述べたように、ランジュバン型振動子は固有振動数付近で振動を励振することで大振幅を得られる振動子である。このため、使用する際は固有振動数での駆動が理想である。ここで、本細胞シート剥離デバイスにおいて、振動面から照射された超音波は培地の表面において反射され、振動子に入射する。すなわち、ランジュバン型振動子に長手方向の固有振動（縦振動）を励振するためには、振動系全体が共振する必要がある。この共振周波数は細胞シート剥離デバイス全体の寸法によって決定される。そこで、細胞シート剥離実験の環境を模した状態でデバイスの固有振動数を測定する。具体的には、グリセロールチャンバに 450 μL のグリセロールを入れ、その上に 2 mL の培地を入れて 72 時間インキュベータの中でインキュベートした培養ディッシュを配置した状態で固有振動数を測定する。前章までは固有振動数の測定にレーザドップラ振動計を用いていたが、本実験系では培地の表面が大きく振動するため、レーザドップラ振動計による振動の測定が不可能である。これは、Figure 4-6 に示すように、培地の表面を振動速度の腹とするような定在波が、システム全体に発生することに起因する¹⁶²。このため、培地の表面が大きく振動し、レーザが乱反射する。そこで、我々は振動子の消費電力に注目した。振動子およびその周囲機器の回路は振動子の等価回路を用いた LCR 共振系で表されることが一般的に知られており、振動子が共振する際は、この回路も共振している。このため、ランジュバン型振動子に印加する交流電圧の周波数を変化させながら、振動子に流れる電流を測定することで共振周波数を測定できる¹⁶³。ここで、電圧は一定であるため、電圧と電流の積である電力は容易に算出できる。そこで、ランジュバン型

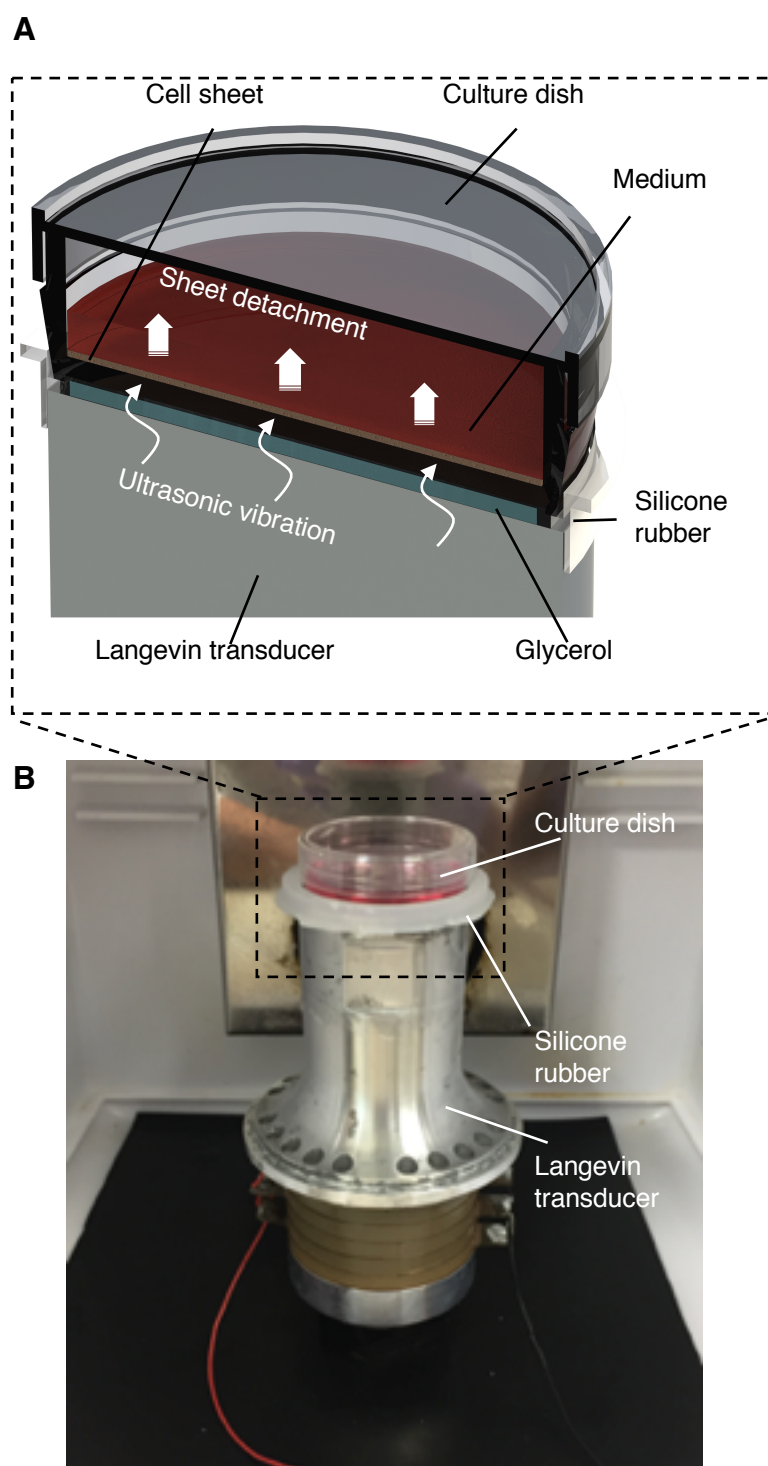


Figure 4-5. Cell sheet detaching device (A) Ultrasonic vibration is applied to cells to detach them from the bottom of the dish. (B) Device in an incubator. The diameter of the dish is 35 mm.

振動子に印加する交流電圧の周波数と消費電力との関係をモニタリングした。Figure 4-7 に示すように、システムに電流プローブ (CT2, Tektronix) を組み込んでランジュバン型振動子へ印加される電流を測定した。Figure 4-8 に振動数と振動子の消費電力の関係を示す。同図からわかるように、本デバイスの固有振動数はおおよそ 19.68 kHz であるが、実験ごとに振動数と振動子の消費電力の関係に差異がある。これは、主に振動子と培地表面との位置関係が異なることに起因する。実験の際にディッシュに挿入する培地の量は決まっているが、振動を励振する前に 72 時間インキュベートするため、培地が蒸発する。このため、振動励振時の培地の量は一定ではなく、培地表面の高さが毎回異なっている可能性がある。さらに、振動子の上にディッシュを配置する際は手作業で行うため、振動子と培地表面の水平方向の距離が一定にならない。こうしたことが固有振動数の差異の原因となり得る。そこで、確実に固有振動を励振するために、振動子に入力する交流電圧の周波数をスイープすることとした。スイープとは、一定の速度で交流電圧の周波数を変化させることである。このようにすることで、確実に固有振動数で振動子を励振できる。具体的には、19.6 kHz から 19.8 kHz を 100 ms の間で 1 往復するようなスイープ信号を用いて振動子を駆動することとした。

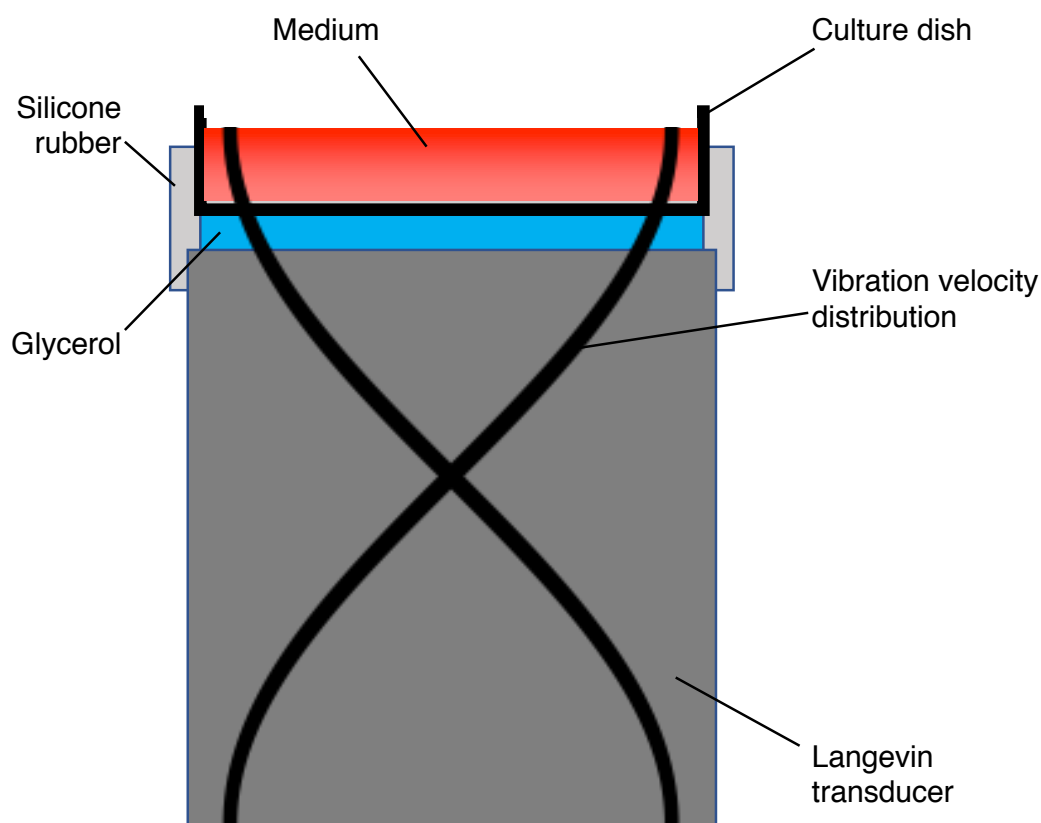


Figure 4-6. The state of the resonance in the cell sheet detaching system.

4.3.2 振幅分布の測定

本細胞シート剥離デバイスにおいて、培養ディッシュ底面に均一な超音波振動が付与されることを確認するために、ランジュバン型振動子の端面の振幅分布を測定した。ただし、4.3.1項で述べたように、本実験系ではレーザドップラ振動計で振幅を測定することができない。そこで、振幅分布を測定する際は培養ディッシュに培地を入れずに振動を励振し、レーザドップラ振動計を用いて振動面の振幅分布を測定した。この際は、Figure 4-9(A)に示す位置の振

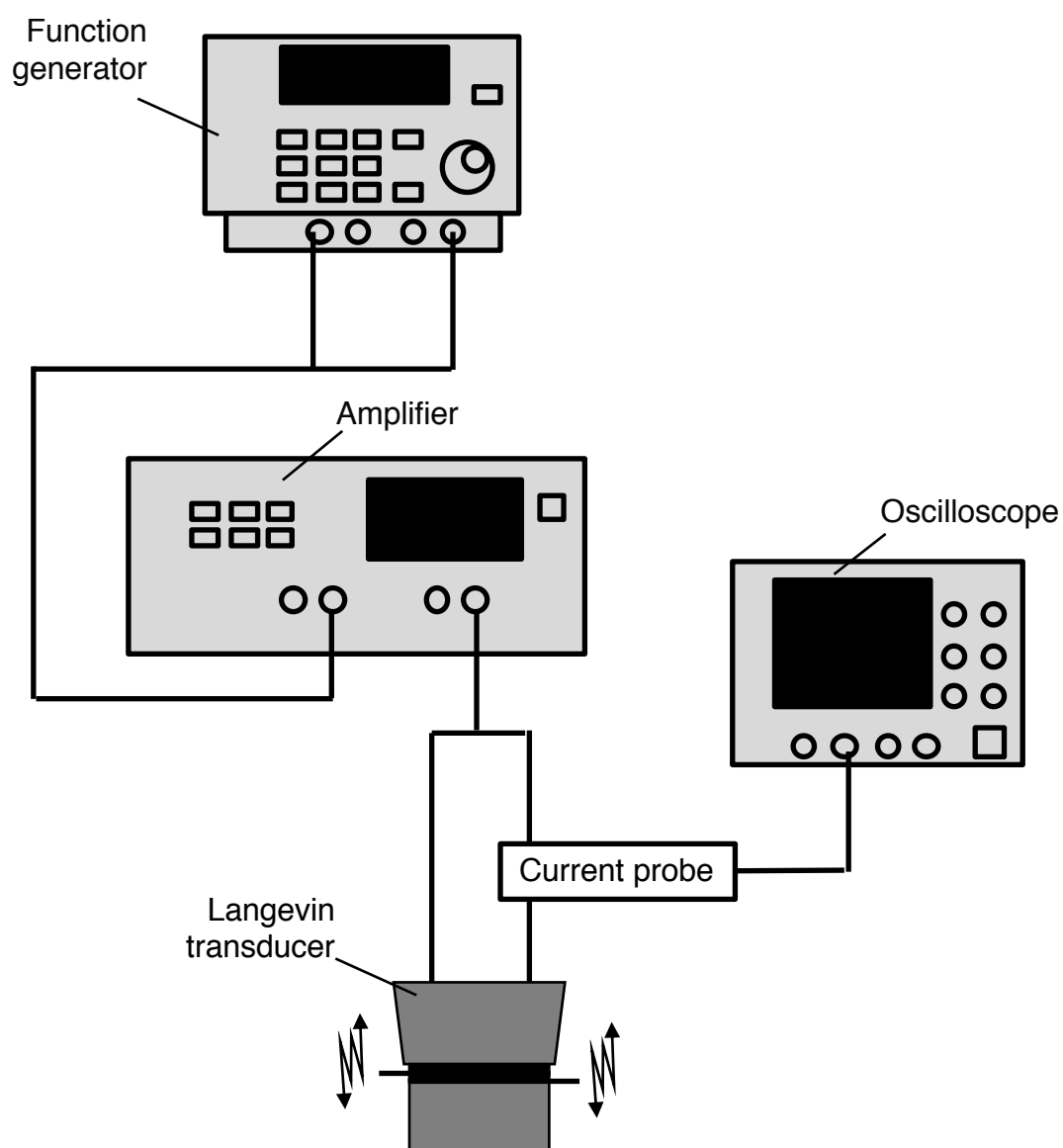


Figure 4-7. Schematic image of how to measure the current.

動振幅を測定した。なお、この際、印加する交流電圧の振動数は 19.68 kHz、電圧は 25 V とした。測定結果を Figure 4-9(B)に示す。同図から、振動子端面全体が均一な長手方向の振動を呈示していることがわかる。このことから、細胞培養ディッシュの底面には均一な超音波が照射されることが確認された。

4.3.3 入力電圧と培地温度の関係

細胞を培養する際は 36-38°Cで培養する必要がある、とくに細胞が高温にさらされた際はタンパク質の変性などの致命的障害が発生することが報告されている¹⁶⁴。一方で、超音波を照射する際は吸収減衰による温度上昇が課題である¹⁶⁵。すなわち、細胞培養環境に対して超音波を照射する際は培地の温度を維持する必要がある。そこで、実験時の培地の温度変化を計測し、超音波の出力を調整する。この際は後述の細胞シート剥離実験を鑑みて、培養ディッシュに 2 mL の培地を配置し、72 h の間インキュベータ内に静置した後、超音波を照射した。温度を計測する際は、雰囲気温度を 37°C、CO₂濃度 5%に制御したインキュベータ内に細胞シート剥離デバイス全体を設置し、温度センサーを培地に浸漬して、3 種類の印加電圧 (12.5 V、

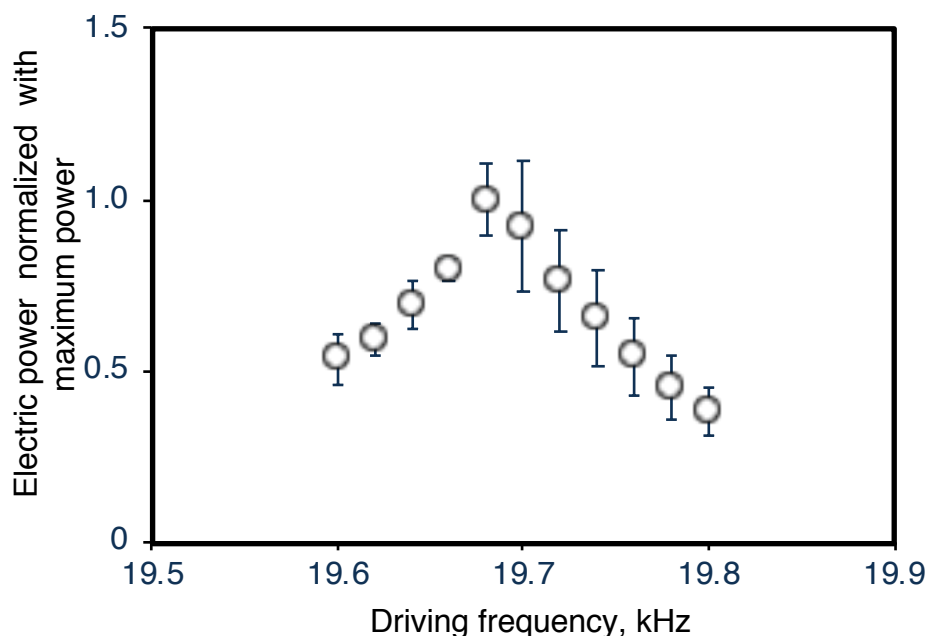


Figure 4-8. Vibration characteristics of the Langevin transducer. Relationship between input frequency and electric power consumption ($n = 3$). Electric power was normalized to the maximum value (12.5 W) at resonance.

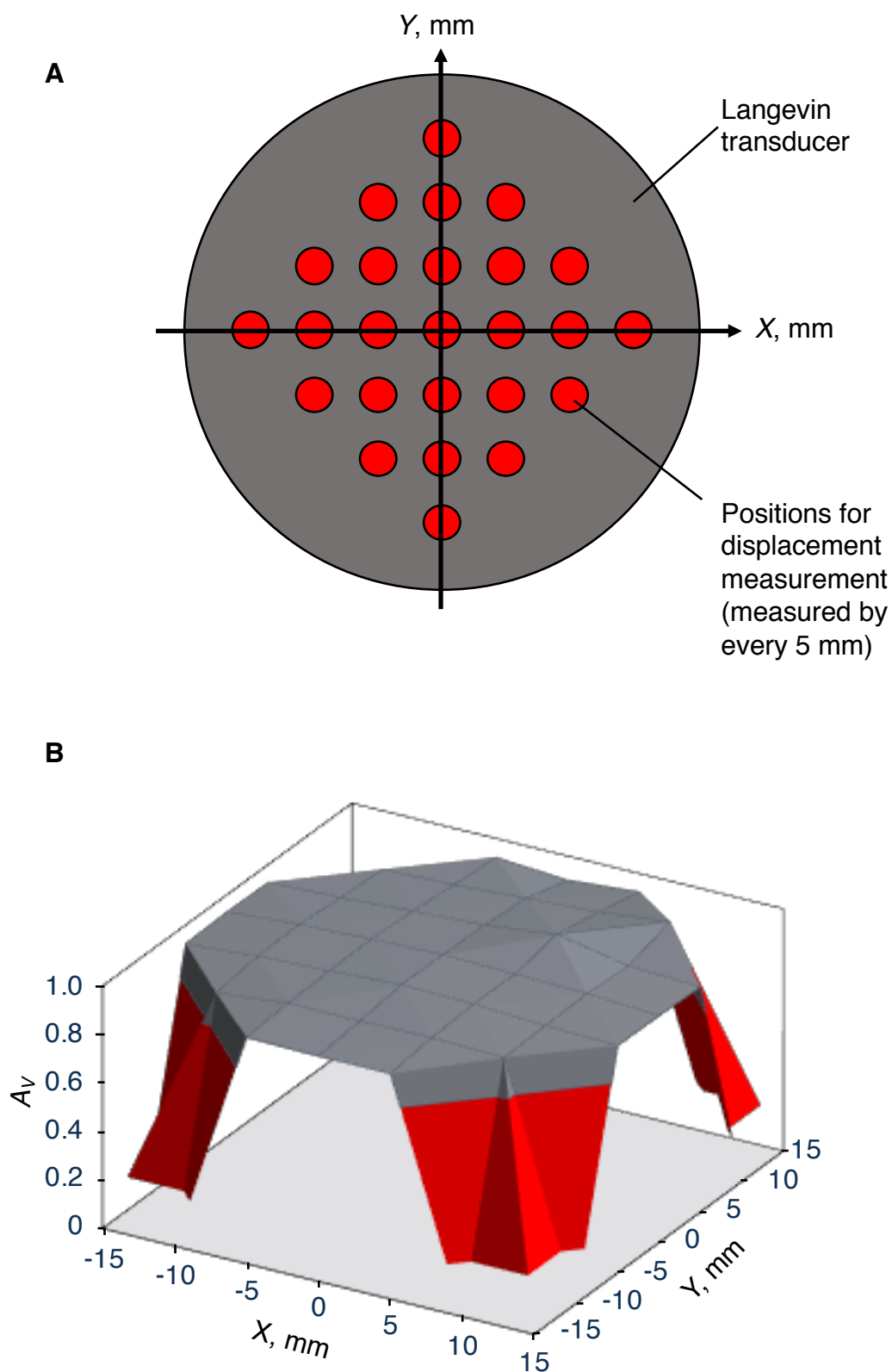


Figure 4-9. Vibration amplitude distribution on the transducer surface measured by a laser Doppler vibrometer. The position of the measurement (A) and the result (B). A_v : vibration amplitude normalized to the maximum value. X and Y : distance from the center of the Langevin transducer along with respective direction.

25.0 V, 37.5 V) によって超音波を照射し, 温度履歴を測定した. なお, 実験の際は 4.3.1 項で述べたように印加する交流電圧の周波数をスイープすることで確実に固有振動を励振した. 測定の結果を Figure 4-10 に示す. 同図からわかるように, 37.5 V の電圧を用いた際は培地温度の上昇が確認され, 38°C を超えた. 一方で, 12.5 V と 25.0 V の印加電圧では温度の上昇は観測されなかったため, 細胞シートの剥離には 12.5 V と 25.0 V の印加電圧を用いることとした.

4.4 細胞シート剥離実験の方法

本節では, 直径 35 mm の汎用的な培養ディッシュを用いた細胞シート剥離実験の方法につ

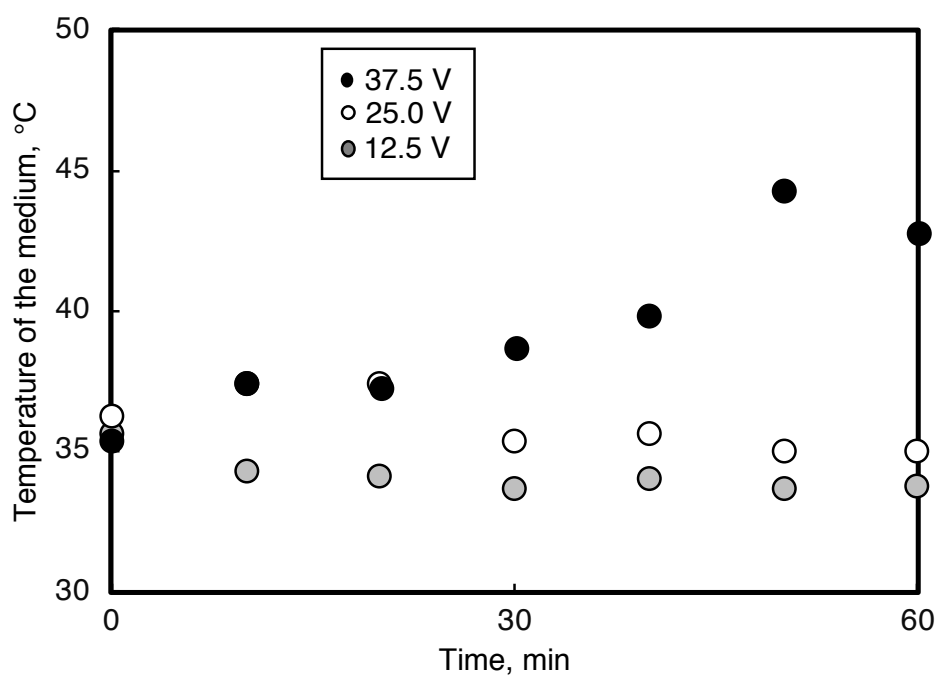


Figure 4-10. Time history of temperature over 1 h of ultrasonic exposure at each input voltage measured by a temperature sensor.

いて述べる。ただし、ここでは培養ディッシュから細胞シートを剥離するまでの実験方法を記述し、細胞シートの機能性を評価する手法については4.6節で述べる。

4.4.1 細胞の準備

本研究では、実験室での細胞シートの生成に一般的に広く用いられているマウス由来筋芽細胞株 C2C12 を用いてコンセプトを確認した。この細胞は3章で用いたものと同じであり、従って継代培養の際の手順は同様である。

4.4.2 細胞シート剥離実験の手順

3章の手順で培養した 6.0×10^5 個の細胞を 2 mL の増殖培地とともに直径 35mm の汎用的な培養ディッシュに播種し、インキュベータ内で 72 時間培養した。その後、グリセロールチャンネルに 450 μ L のグリセロールを入れ、その上に気泡が入らないようにディッシュを配置した。これらの実験系全体をインキュベータ内に配置し、4.3.1 項で示した条件で 12.5 V および 25.0 V の交流電圧をスイープさせて印加しながら細胞シートの剥離を行った。

4.5 細胞シート剥離実験の結果および考察

前節で示した条件で、細胞シートを剥離する実験を行った結果について、振動振幅が細胞シートの剥離に与える影響、および細胞シートが剥離するまでの時間について述べる。

4.5.1 印加電圧と細胞シート剥離の関係

4.3.1 項に記したように本実験系では、振動子の振動振幅を直接測定することができない。しかし、振動子の振幅は印加する電圧に対して、線形に単調増加することが知られており、この結果は2章および3章の Figure 2-17 および Figure 3-16 から示されている¹⁶⁶。このことから、本章では、入力する振動刺激の大きさの基準に印加電圧を用いることとした。

Figure 4-11 に各電圧における細胞シート剥離実験の様子を示す。12.5 V の印加電圧を用いた際は1時間振動を励振した後の培養ディッシュの様子を示した。一方で、25 V の印加電圧を用いた際は細胞シートが剥離した後に振動を止めた。ただし、25 V の印加電圧を用いて細胞を剥離した際の振動の励振時間は1時間以内である。なお、1時間というのは、温度応答性培養ディッシュを用いた細胞シートの剥離に要する時間である¹⁶⁷。また、どちらの印加電圧

を用いた場合でも、培地を除去した後に写真を撮影した。

同図からわかるように、励振する振動の振幅が不十分（印加電圧 12.5 V）である際は1時間以内に細胞シートを剥離することができなかった。また、細胞は周囲に位置する他の細胞と接着を形成するため、Figure 4-11(A)に示すように細胞シートが折り重なった状態で一定時間以上経過すると、重なった状態で細胞同士が接着してしまう。このようになると、その部分の細胞のみが周囲の細胞と比較して培養環境が異なってしまう。具体的には、細胞が積層

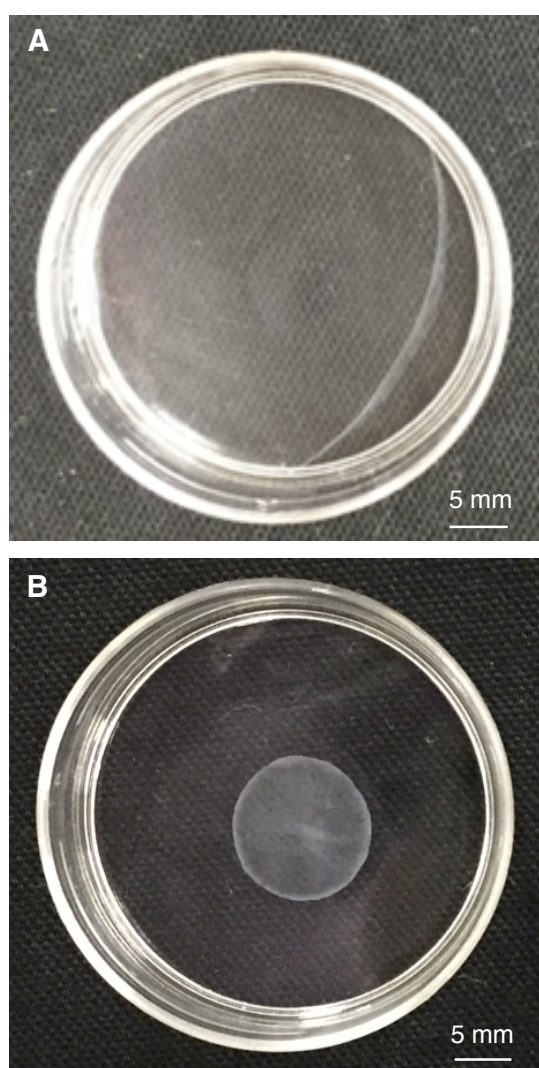


Figure 4-11. Cell sheets after ultrasonic exposure for 1 h at input voltages of (A) 12.5 V or (B) 25 V.

したことによる培地の拡散能の違い，および周囲の細胞と接着することによる力学的刺激の付与などが，その他の部分の細胞との培養環境の違いとして挙げられる¹⁶⁸⁻¹⁷⁰．このため，細胞シートが折重なった部分の細胞の性質が周囲と異なる恐れがある．

一方で，25 Vの印加電圧を用いた際は，Figure 1-14で紹介したものと類似した形状の細胞シートを剥離することができた．このため，細胞シートの剥離には至適な振動振幅があることが明らかになった．また，25 Vの印加電圧を用いた際の細胞シートの剥離の仕方を示すために，剥離の最中の写真を取得した (Figure 4-12)．この結果，提案手法によって細胞シートは周辺部分から剥離することがわかった．この剥離の仕方は従来手法を用いた際の細胞シートの剥離と類似している．

本項から，提案手法によって，細胞シートを剥離できること，剥離した細胞シートの形状および剥離中の挙動が従来手法に類似していることが明らかになった．なお，上記の結果から，以降の実験では25 Vの印加電圧を用いて細胞シートの剥離を行った．

4.5.2 細胞シートの剥離に要する時間

前項で細胞シートの剥離に至適な振動振幅が存在すること，およびその際の細胞シートの

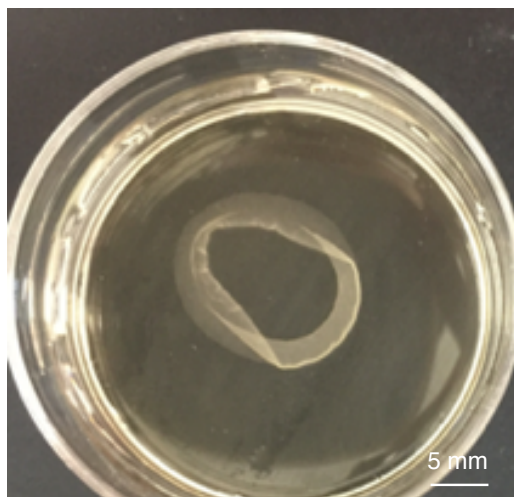


Figure 4-12. Appearance of cell sheets detached at an input voltage of 25 V.

形状や剥離の仕方が従来手法と類似していることを明らかにした。本項では、本手法の再現性を評価するため、細胞シートの剥離に至適な振動振幅を実現する 25 V の交流電圧を印加した際に、細胞シートの剥離に要する時間を測定した。この結果を Figure 4-13 に示す。同図からわかるように、全 45 サンプルに対して 95.6% のサンプルが 1 時間以内に培養面から完全に剥離したことが確認された。さらに、1 時間で剥離しきれなかった 3.8% のサンプルについてもタッピングなどの手技によって容易に剥離できることを確認した。

この傾向は従来手法による細胞シートの剥離に類似しており、提案手法が実用に要求される再現性を有していることが示唆される。

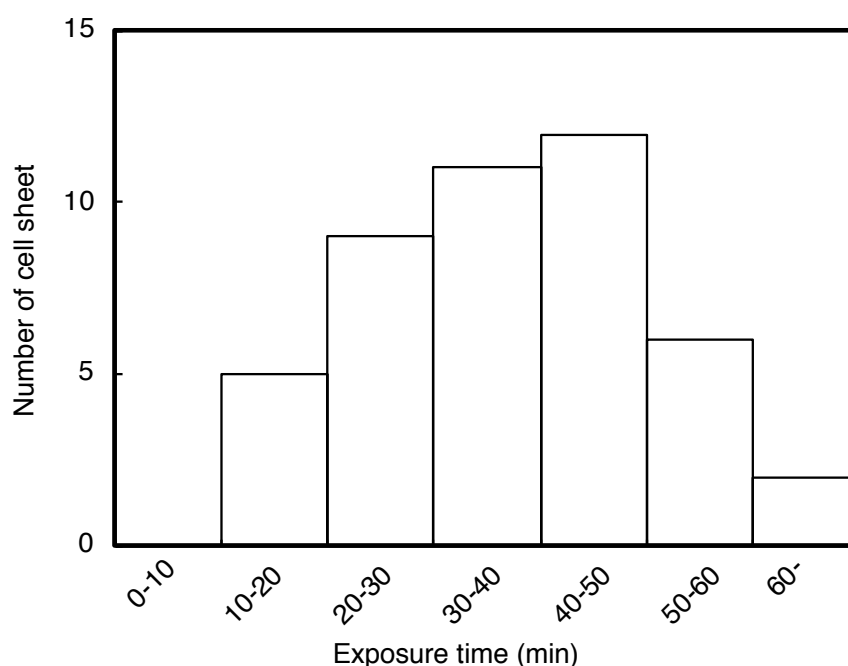


Figure 4-13. Number of cell sheets successfully detached with the corresponding duration of ultrasonic exposure and input voltage of 25 V. Note that the total number of trials was 45.

4.6 剥離した細胞シートの評価方法

前節から、細胞シートの剥離には至適な振動振幅があること、その際に安定して細胞シートを剥離できることが明らかになった。本節では、本手法で剥離した細胞シートの機能性を評価する方法について示す。具体的には剥離直後の細胞シートを染色する方法、および剥離後24時間培養した細胞シートのタンパク質発現と代謝を測定する方法について述べる。

4.6.1 細胞シートの染色

本項では、細胞シートに施したそれぞれの染色の方法について詳細に述べる。具体的には、提案手法で剥離した直後の細胞シートに対して、Calcein AMによる生細胞の染色、Hematoxylin and eosin stain (HE染色)、およびFibronectinの免疫蛍光染色を行った。

Calcein AMによる生細胞の染色について述べる。基本的な手順は2.5.3項で述べたが、シート状に剥離した細胞の染色を行うためにプロトコールに修正を加えた。細胞シートの剥離を確認したのちに、50 mLピペット(94550, Corning)を電動ピペッター(S1-9511JP, Thermo Fisher Scientific)に装着し、シートを破かないように留意しつつ、培地ごと細胞シートを吸引し、新しい細胞培養ディッシュに移送した。その後、1000 μ Lチップ(111-R100NS-Q, ビーエム機器株式会社)を装着した1000 μ Lピペット(728070, Sartorius)を用いて、細胞シートの周囲にある培地を除去した。この後に、細胞シートをインキュベータに入れて20分ほど培養することで細胞シートを培養面に接着させた。これは細胞シートを通常の量の培地に浸漬すると、細胞にかかる浮力によって、細胞シートの培養ディッシュの表面への接着が阻害されるためである¹⁶⁷。細胞シートが培養面に接着したことを確認したのちに、培養面をPBSで2回洗浄することで培地内のFBSに含まれるCaを除去し、無血清培地2 mLに4 μ LのCalcein AMを混合した染色液を2 mLディッシュに導入してインキュベータ内で30分間インキュベートした。その後、染色液を除去し、培養面をPBSで洗浄し、無血清培地で培養面を満たして蛍光写真を取得した。蛍光染色した細胞シートを撮影する際には3.5.3項で用いた手法を用いて、細胞シート全体を撮影した。

次に、HE染色の方法について述べる。HE染色は細胞組織の形態を観察するために広く用いられる染色方法であり、染料であるヘマトキシリンとエオシンで細胞核および細胞質をそれぞれ青紫色と紅色に染色する¹⁷¹。HE染色を行う際には、まず組織の凍結切片を作製して、この切片をHE染色する。凍結切片の作製方法を以下に示す。まず、提案する手法で細胞シートを剥離した。次に、細胞シートを表面無処理の直径35 mmの浮遊細胞用培養ディッシュ(11-002-002, 関谷理化株式会社)に移送した。この上に細胞シート回収用支持体(CellShifter, セ

ルシード) を配置し, 20 分ほどインキュベータ内でインキュベートすることで細胞シートを CellShifter に接着させた. 接着を確認した後に, 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (09154-56, ナカライテスク株式会社) に浸漬させて 4°C で一晩静置することで細胞組織を固定した. つぎに, 凍結する際の氷晶の発生を防止するため, 20%スクロース溶液/PBS に浸漬させて 4°C で一晩静置した. 続いて, 細胞シートおよび CellShifter を適当な大きさにトリミングした. OCT コンパウンド (サクラファインテックジャパン株式会社) でクリオモルド (サクラファインテックジャパン株式会社) を半分程度まで満たした. トリミングした細胞組織をピンセットを用いて垂直な状態に保ってクリオモルドに挿入し, 液体窒素で凍結させることで包埋した. 細胞シートが固定されたことを確認し, クリオモルド内にさらに OCT コンパウンドを充填し, 再度凍結処理を施した. 続いて, クライオスタット (Cryostat Microm HM 525, Thermo Fisher Scientific) を用いて, 厚さ 6 μm の凍結切片を作成し, 剥離防止の表面改質が施されたスライドガラス (SMAS-04, 松浪硝子工業株式会社) に貼り付けた. この際, クライオスタット内の温度は -20°C とした. 作製した切片はドライヤーの冷風によって急速に乾燥させ, ディープフリーザにて保存した. この際, 凍結融解を繰り返さないように注意した.

作製した凍結切片に対して HE 染色を行った. Figure 4-14 は, 染色に用いた各溶液をドラ

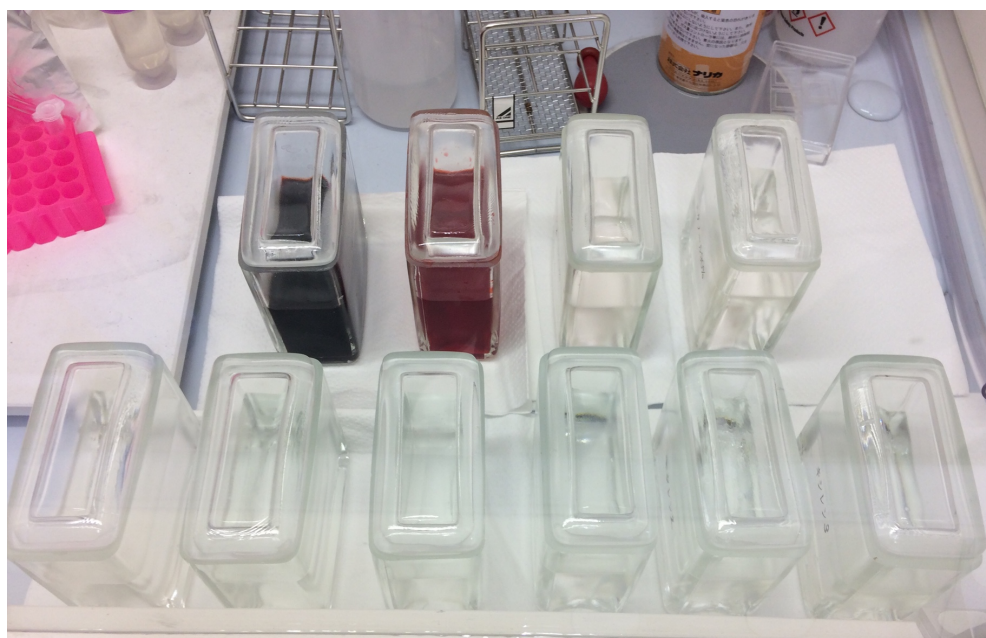


Figure 4-14. Preparation of hematoxylin and eosin stain

フト内に準備した様子である。まず、凍結切片を超純水に浸漬した後、ヘマトキシリン溶液（131-09665, 和光純薬工業株式会社）に3分間浸漬して、10分程度流水で洗浄することで細胞核を染色した。つぎに、エオジン溶液（1%エオジン Y 溶液, 051-06515, 和光純薬工業株式会社）に5分間浸漬することで細胞質を染色し、水道水に一瞬浸漬した。その後、70, 90, 100%エタノールに順に10秒程度漬けて脱水した。この後、キシレン（キシレン, 244-00086, 和光純薬工業株式会社）に数秒間浸漬して脱水し、最後に封入剤（標本用封入剤 NEW M・X, 松浪硝子工業株式会社）とカバーガラスを用いて封入した。なお、100%エタノールおよびキシレンにはそれぞれ3回ずつ浸漬した。

最後に Fibronectin の免疫蛍光染色の方法について述べる。Fibronectin の局在を明らかにするために本実験を行うため、細胞シートを剥離した後に、元の細胞培養ディッシュ上で以下の手順に従って染色を行った。冷凍庫で -20°C に氷冷したメタノール 2 mL (25183-00, 関東化学株式会社) を培養ディッシュに入れて、室温で5分間静置することで固定した。つぎに、TritonX/PBS (0.1%) に浸漬して、室温で15分間静置することで透過処理を行い、10% goat serum/PBS に浸漬して室温にて1時間静置した。続いて、1次抗体として mouse anti-human fibronectin monoclonal antibody (ab194395; Abcam)濃度 $1\ \mu\text{L}/\text{mL}$ で2時間程度、2次抗体として Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG H&L (ab150117; Abcam)濃度 $1\ \mu\text{L}/\text{mL}$ で30分間それぞれ室温で静置した。なお、この際、各試薬をブロッキングバッファで希釈した。染色されたサンプルを蛍光顕微鏡で観察した。

4.6.2 ウェスタンブロッティング (WB)

提案手法および従来手法で剥離した細胞シートに対する WB の方法を記述する。なお、本章では細胞と培地に対してそれぞれ WB を実行する。

剥離した細胞シートを新しい培養ディッシュに移送した後に、培養面への接着を促進するため、培地を除去して20分程度インキュベータ内で培養した。細胞シートが接着したことを確認した後に、培地を用いてディッシュ内を2度洗浄した。洗浄後、2 mL の培地を培養ディッシュに導入し24時間培養した。

その後、チューブに培養上澄みを保存した後にディープフリーザで凍結した。細胞シートに関しては、培養ディッシュ内部を PBS で2度洗浄した後に、ディッシュごと液体窒素に浸漬することで凍結し、ディープフリーザで保存した。その後、凍結融解を避けて WB を行った。ただし、細胞シート全体を用いると細胞数が多く操作が煩雑になるため、細胞シートを医療用メスで4等分して、全体の4分の1を用いた。その後、3.5.5項と同様の手法で WB の実験を行った。

本実験ではローディングコントロールとしてハウスキーピング遺伝子である β -actin を用

いた³⁴。なお、 β -actinの定量には、一次抗体として1,000-fold dilution of rabbit anti-mouse β -actin polyclonal antibody (#4967; Cell Signaling Technology)を、二次抗体として anti-rabbit IgG (62-6120; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を用いた。さらに、細胞に存在するタンパク質として、Fibronectin, Myocin Heavy Chain (MHC), Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), と Integrin α 5 をターゲットとした。また、培養上澄みに析出するタンパク質としては Vascular endothelial growth factor (VEGF)と stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)をターゲットとして選択した。このため、Fibronectin の検出のために、一次抗体として 0.4 μ g/mL mouse anti-human fibronectin monoclonal antibody (ab194395, Abcam)を、二次抗体として Anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat (A4416-1 mL, sigma) を、Integrin α 5 の検出のために、一次抗体として 500-fold dilution of rabbit anti-human integrin α 5 polyclonal antibody (#98204; Cell Signaling Technology, Boston, MA, USA)を、二次抗体として anti-rabbit IgG (62-6120; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を、LIFR の検出のために一次抗体として 0.4 μ g/mL rabbit anti-human LIFR polyclonal antibody (22779-1-AP; Proteintech, Rosemont, IL, USA)を、二次抗体として anti-rabbit IgG (62-6120; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を、MHC の検出のために、一次抗体として 2 μ g/mL mouse anti-chicken MHC monoclonal antibody (MF20; R&D systems, Minneapolis, MN, USA)を、二次抗体として 10,000-fold dilution of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG (12-349; Sigma-Aldrich)を、VEGF の検出のために、一次抗体として 0.5 μ g/mL rabbit anti-human VEGF polyclonal antibody (R30265; NSJ Bioreagents, Carmel Mountain Ranch, CA, USA)を、二次抗体として anti-rabbit IgG (62-6120; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を、SDF-1 の検出のために、一次抗体として 1 μ g/mL rabbit anti-human SDF-1 polyclonal antibody (41422; Signalway Antibody, College Park, MD, USA)を、二次抗体として anti-rabbit IgG (62-6120; Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)を用いた。上記の抗体と染色したタンパク質を Table 4-1 に示す。

なお、提案手法で剥離した細胞シートのタンパク質発現を、温度応答性培養ディッシュを用いた従来手法によって剥離した細胞シートと比較するために、それぞれの手法で剥離した細胞シートに対して WB を行った。

4.6.3 代謝の定量

細胞シートの代謝を定量するため、細胞シート剥離後 24 時間培養した際のグルコースの消費量と乳酸の生成量を定量した。これらは細胞の代謝を評価する際の一般的な指標である¹⁷²。以下に具体的な手法を記述する。細胞シートを剥離した後に、新しい接着細胞培養用ディッシュに細胞シートを移送し、周囲の培地を除去してインキュベータ内において 20 分程度イン

キュベートすることで細胞シートを培養面に接着させた。その後、2 mL の培地を加えて、インキュベータで 24 時間インキュベートした。24 時間後に、培養上澄みを回収し、グルコースアッセイキット (GAHK-20, Sigma-Aldrich) と乳酸アッセイキット (K607-100, BioVision) を用いて、培養上澄み内のグルコースの消費量と乳酸の生産量を測定した。上記のキットを用いて吸光度を測定するプロセスでは、プレートリーダー (51119050, Thermo Fisher Scientific) を使用した。

なお、提案手法で剥離した細胞シートの代謝を、温度応答性培養ディッシュを用いた従来手法によって剥離した細胞シートのそれと比較するために、それぞれの手法で剥離した細胞シートに対して代謝の定量を行った。

Table. 4-1 Protein and antibody for immunostaining

Protein	Primary antibody	Secondary antibody
Fibronectin	Mouse anti-human fibronectin monoclonal antibody	Anti-mouse IgG (whole molecule)-peroxidase antibody produced in goat
Integrin α 5	Rabbit anti-human integrin α 5 polyclonal antibody	Anti-rabbit IgG
LIFR	Rabbit anti-human LIFR polyclonal antibody	Anti-rabbit IgG
MHC	Mouse anti-chicken MHC monoclonal antibody	Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG
B-actin	Rabbit anti-mouse β -actin polyclonal antibody	Anti-rabbit IgG
VEGF	Rabbit anti-human VEGF polyclonal antibody	Anti-rabbit IgG
SDF-1	Rabbit anti-human SDF-1 polyclonal antibody	Anti-rabbit IgG

4.7 剥離した細胞シートの評価結果および考察

4.5節において、振動を用いることによって、汎用的な培養ディッシュから細胞シートが剥離できることが明らかになった。剥離した細胞シートの機能性を評価するために4.6節で述べたアッセイを行った結果および考察を以下に示す。

4.7.1 剥離した直後の細胞シートの機能性

本項では剥離した直後の細胞シートの状態を評価する。すなわち、細胞の Viability (生存度)、詳細な形態、および初期接着能力に関して4.6.1項で記した実験に基づいて結果を示し、考察を加える。

まず、細胞の Viability について、Figure 4-15 にカルセイン染色の結果を示す。同図からわ

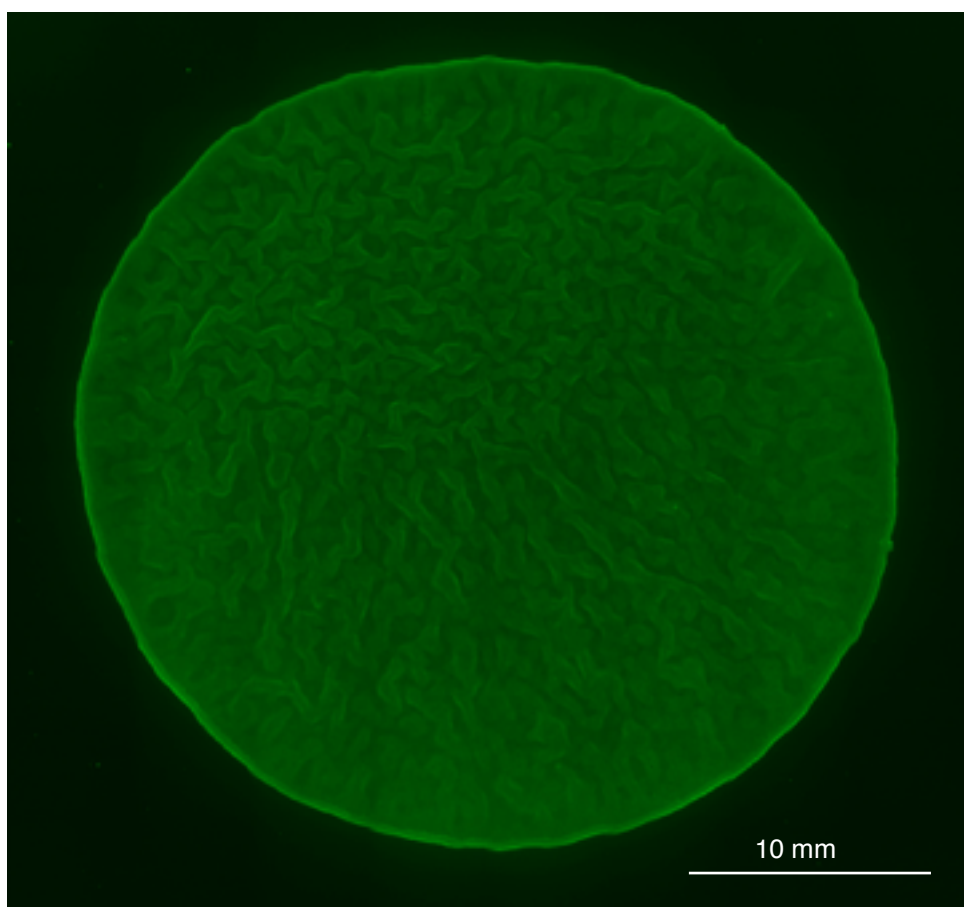


Figure 4-15. Entire calcein-stained cell sheet

かるように、剥離した細胞シートは生細胞によって構成されている。このことから、提案手法によって生細胞で構成された細胞シートを剥離できたことが示された。

つぎに、細胞の詳細な形態について、結果および考察を述べる。HE染色の結果を Figure 4-16 に示す。同図で示す細胞シートの断面図は先行研究で示されているモノレイヤーの細胞シートのそれと類似している。このことから、振動によって細胞シートの形態が変化していないことが確認された。細胞の形態に関して詳細に述べる。発生しうる形態変化について、3つの可能性が予測される。1つ目は、細胞膜の破砕である。これは、超音波を用いた細胞の破砕装置があることから容易に予測できる¹⁷³。しかし、Figure 4-16 に破砕された細胞膜の残骸などを確認することはできなかった。2つ目は、細胞の分散である。これは、本研究においては超音波を下方から上方に照射することで細胞に対して上向きの圧力を加えているため、細胞同士の接着が細胞と培養面との接着と比較して弱かった場合に、細胞が単一状態で剥がれる可能性があった。しかし、細胞同士は密に接着しており、細胞の分散は確認されなかった。3つ目は細胞シートが折り重なる可能性である。Figure 4-11(A)に示したように、用いる振動によっては細胞シートが折り重なってしまう。元々、Figure 4-16 に示したように、肉眼で見る

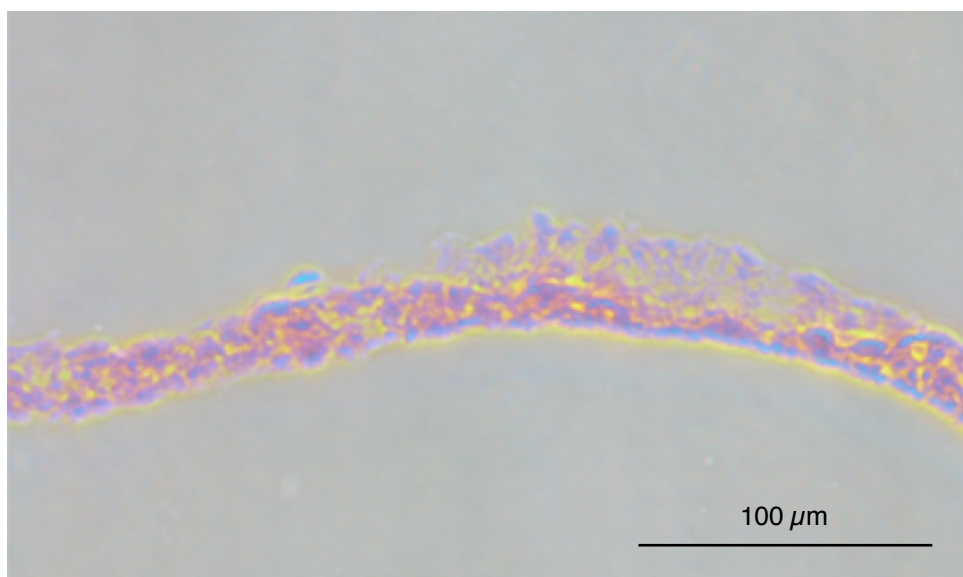


Figure 4-16. Cross-section view of an HE-stained cell sheet observed by phase-contrast microscopy.

限りはモノレイヤーの細胞シートであるが、HE染色を行うことによって、これを詳細に確認した。さらに、剥離された細胞シートの厚さは最大でおおよそ40 μm でほぼ均一であることがわかった。細胞シートの厚さが細胞の機能性に関係することが、細胞シートを積層して培養した先行研究から明らかになっているため、厚さが均一な細胞シートを生成することは細胞シートを構成する細胞の機能性を均一にすることにつながる。また、立体的な細胞組織はその厚さが150-200 μm を超えると培地が行き渡らず細胞が壊死すると報告されている¹⁶⁸。このため、厚さが40 μm 程度以下である本細胞シートでは、細胞の壊死が起こる可能性は極めて低いと推察される。

最後に、Fibronectinの染色結果について結果および考察を述べる。まず、Fibronectinを染色した理由から述べる。1.2.2項でも述べたように、細胞シートの最大の特徴は細胞外マトリクスの存在である。細胞外マトリクスは細胞の活性を維持するために非常に重要なファクターである。その中でも、細胞シートの生着に大きく影響するFibronectinを染色して、これの局在を調べた。提案手法で剥離した細胞シートのFibronectinを染色した結果の蛍光写真をFigure 4-17に示す。この染色を行う際は細胞シートを新たな培養ディッシュに移送せず、元々細胞が接着していた培養ディッシュを用いた。すなわち、Fibronectinの一部が培養ディッシュの表面に残存していた場合はそれが染色されるはずである。しかし、同図からわかるように、細胞シートが存在する部分にはFibronectinが存在する一方で、細胞シートがない領域にはFibronectinが存在しない。このことから、提案手法によって培養面上のFibronectinの全てが細胞シートとともに剥離したことが明らかになった。これは従来手法と同じ結果であり、提案手法で剥離した細胞シートの初期生着率は従来手法と同様であると期待される。また、本研究では細胞外マトリクスを構成するタンパク質の1つであるFibronectinの局在を確認したのみだが、筆者の知る限りでは、細胞外マトリクスを構成するタンパク質の一部のみが、自然に離脱する現象は報告されていない。このことから、提案手法で剥離した細胞シートは細胞外マトリクスを構成するその他のタンパク質も有していると考えている。

本項の結果から、提案手法によって剥離した直後の細胞シートは従来手法と比較して同等の機能を有していることが伺える。

4.7.2 剥離した細胞シートのタンパク質発現

前項では、剥離直後の細胞シートの機能性を詳細に調査し、考察を加えた。本項では提案手法によって剥離後24時間培養した細胞シートの機能性を従来手法で剥離した細胞シートと比較する。具体的には、24時間培養したそれぞれの細胞シートおよび培養上澄みにWBを行うことによってタンパク質発現を測定し、比較した。

4.6.2項で述べたように、本実験では6種類のタンパク質の発現量を検査する。ターゲット

としたタンパク質はそれぞれ特徴を有する。Fibronectin は細胞外マトリクスを構成するタンパク質の1つであり、細胞の接着に関与する。Integrin $\alpha 5$ は細胞膜に存在するタンパク質であり、細胞と細胞外マトリクス、とくに Fibronectin との接着に関与する¹⁷⁴。LIFR は細胞膜に存在するタンパク質であり、本研究で用いた筋芽細胞の分化に関与する¹⁶⁴。MHC は細胞質に存在するタンパク質であり、筋芽細胞の分化の指標として用いられている¹⁶⁴。VEGF と SDF-1 は細胞から培養上澄みに析出されるタンパク質であり、前者は細胞の血管新生を誘導し、後者は細胞のアポトーシスを抑制する¹⁷²。ここで、これらの培養上澄みに存在するタンパク質は細胞から析出されたものであり、サイトカインと呼ばれる。細胞シートを移植する際は、細胞自体を移植する、という意味合いとは別に、細胞を移植することで、ここから析出するサイトカインによって治療を試みる場合もある¹⁷⁵。このため、サイトカインの析出に問題が

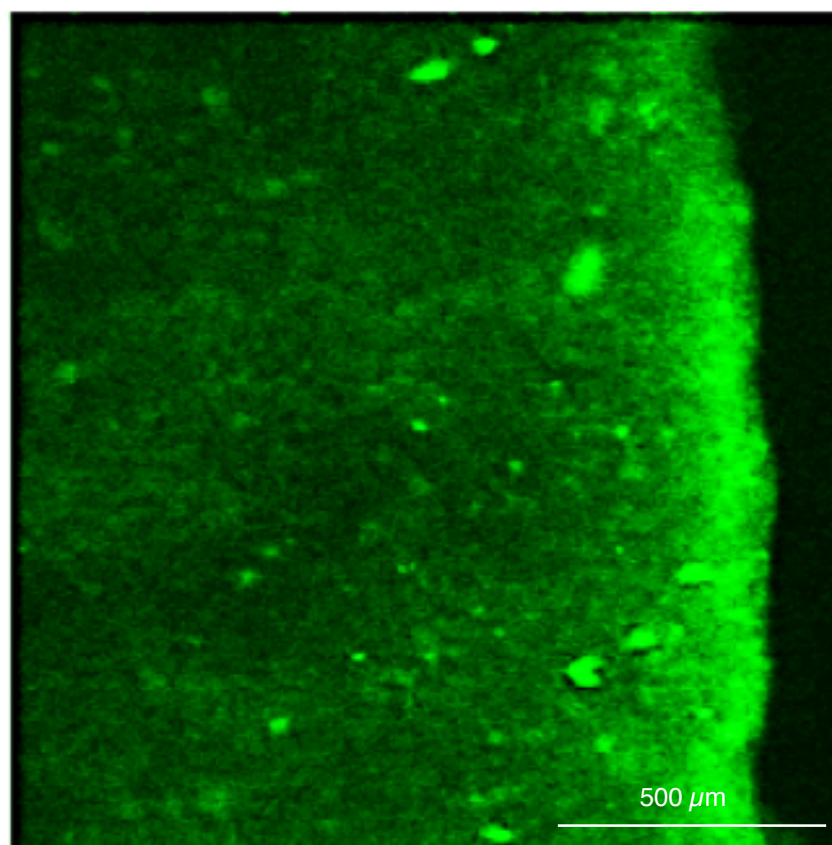


Figure 4-17. The edge of a fibronectin-stained cell sheet observed by fluorescence microscopy.

ないことは確認すべき事項である。とくに、この2種類のサイトカインは、細胞シートの移植の際に重要である。まず、血管新生は細胞シートが移植後に生存するために必須である。さらに、プログラムされた細胞死であるアポトーシスを抑制することは、細胞シートの移植を行う目的の一つでもある¹⁷⁶。これら、ターゲットとして用いたタンパク質とその特徴については Figure 4-18 に示す。このように、それぞれ異なる部位に存在し、その機能も異なるタンパク質をターゲットにしたため、超音波振動が細胞に与える影響を詳細に把握できると考えられる。WBの結果を Figure 4-19 に示す。同図から、各タンパク質は妥当な濃度で検出できていることがわかるため、この結果から、各タンパク質の発現量をそれぞれの条件（提案手法と従来手法で剥離した細胞シート）の β -actin で正規化し、従来手法で剥離した細胞シートのサンプルから検出されたタンパク量を1として定量した（Figure 4-20）。同図から、いずれのタンパク質も超音波照射によって異常な発現を引き起こしていないことがわかる。前述した通り、ターゲットとしたタンパク質は、それぞれ異なった部位に局在し、異なった役割を有している。このことから、提案手法では超音波を用いて細胞シートを剥離しているが、細胞の機能性の変化は発生していないと考えられる。

本項で確認された知見とここまで得られた知見を合わせると、提案手法によって、汎用的な培養ディッシュから、温度低下を用いずに、従来手法と同様の時間で、従来手法と同様の機能性を有する細胞シートを剥離できると言える。

4.7.3 剥離した細胞シートの代謝

最後に、提案手法で剥離した細胞シートの剥離後 24 時間培養中の代謝を測定した。なお、

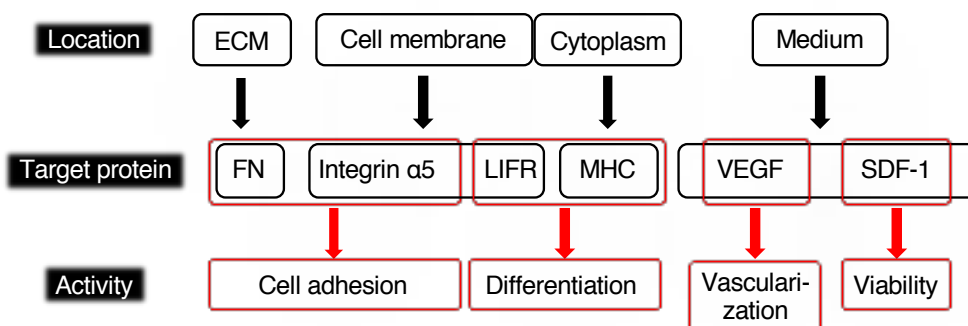


Figure 4-18. The target proteins for WB

従来手法で剥離した細胞シートの代謝も測定し、比較した。代謝を測定するために、培養上澄み中のグルコースの消費量および乳酸の生産量を定量した。この結果を Figure 4-21 に示す。同図から分かるように、いずれの指標においても提案手法が、従来手法を上回っている。このことから、提案した手法によって剥離した細胞シートは従来手法で剥離した細胞シートよりも、剥離後 24 時間における代謝が高いことが明らかになった。

ここで、細胞シートの代謝が高いことから、細胞シート全体で見た際の活動が活性化して

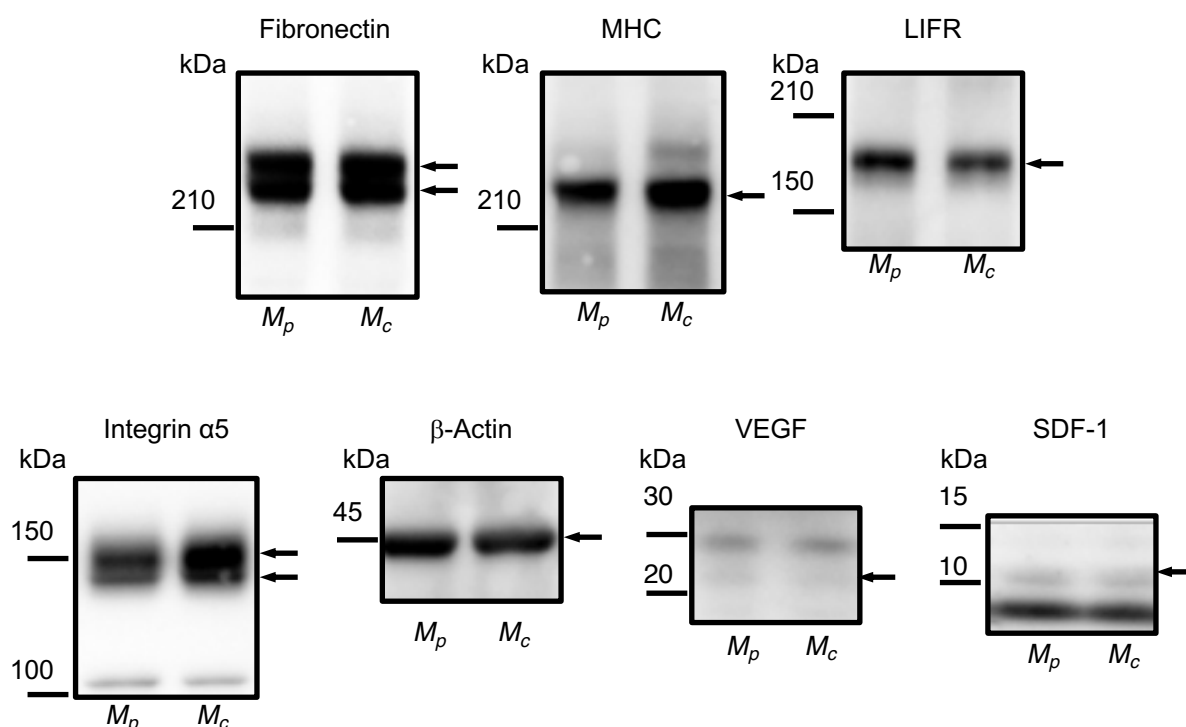


Figure 4-19. Cell sheets collected by the proposed method (M_p) and conventional method (M_c) were lysed in SDS-PAGE sample buffer, and proteins were analysed by western blotting with the following antibodies: anti-fibronectin (220 kDa, first panel), anti-myosin heavy chain (MHC, 220 kDa, second panel), anti-leukaemia inhibitory factor receptor (LIFR, 190 kDa, third panel), anti-integrin $\alpha 5$ (150 kDa, fourth panel), anti- β -actin (45 kDa, fifth panel), anti-vascular endothelial growth factor (VEGF, 22 kDa, sixth panel), and anti-SDF-1 (10 kDa, seventh panel). Arrows indicate target bands. Relative protein quantities

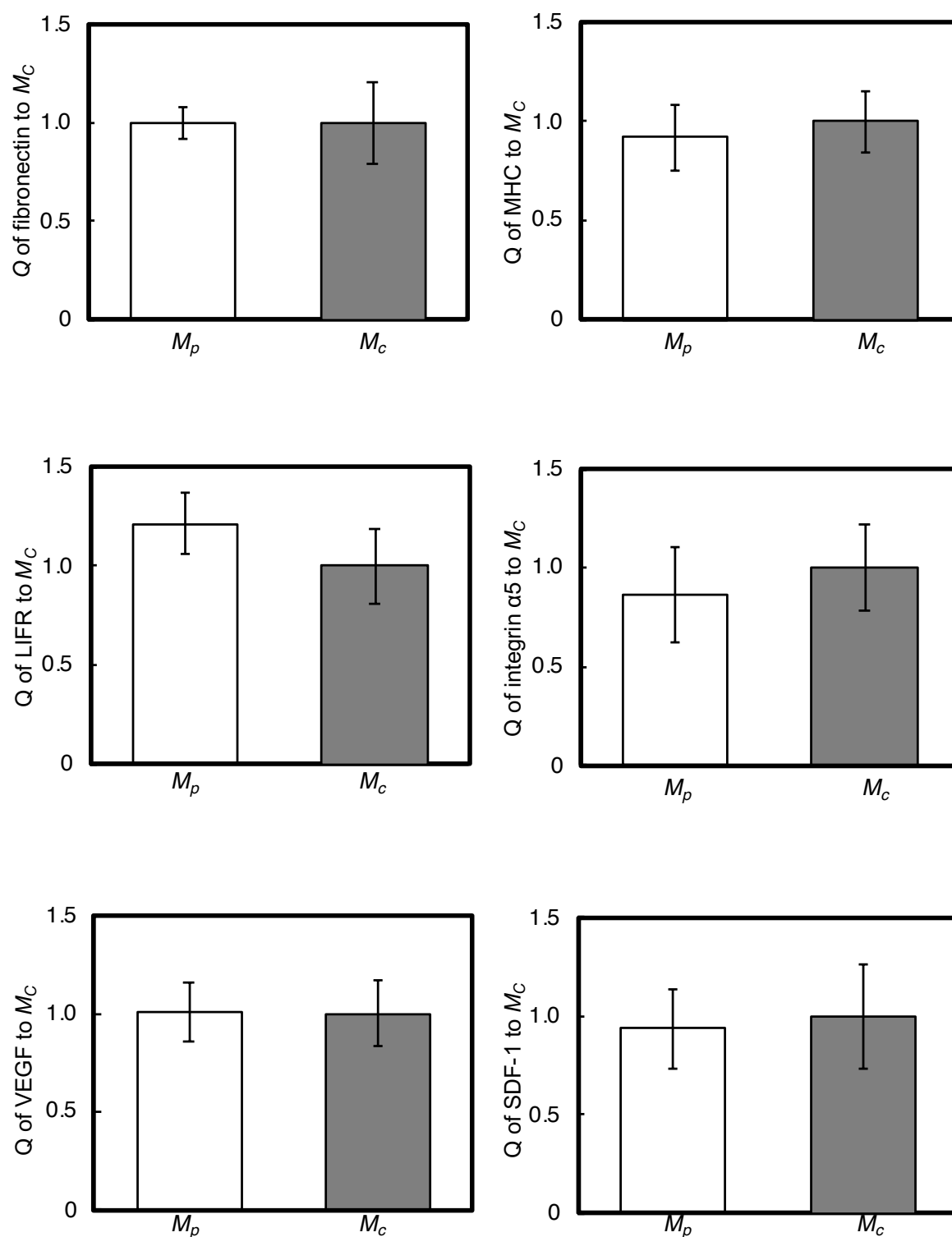


Figure 4-20. Comparison of protein expression in cell sheets. Quantities (Q) of fibronectin, MHC, LIFR, integrin $\alpha 5$, VEGF, and SDF-1 were measured using their band densities on western blots. Protein quantities were normalized to the band density of β -actin and expressed as the quantity relative to the conventional method (mean \pm SD, $n = 4$).

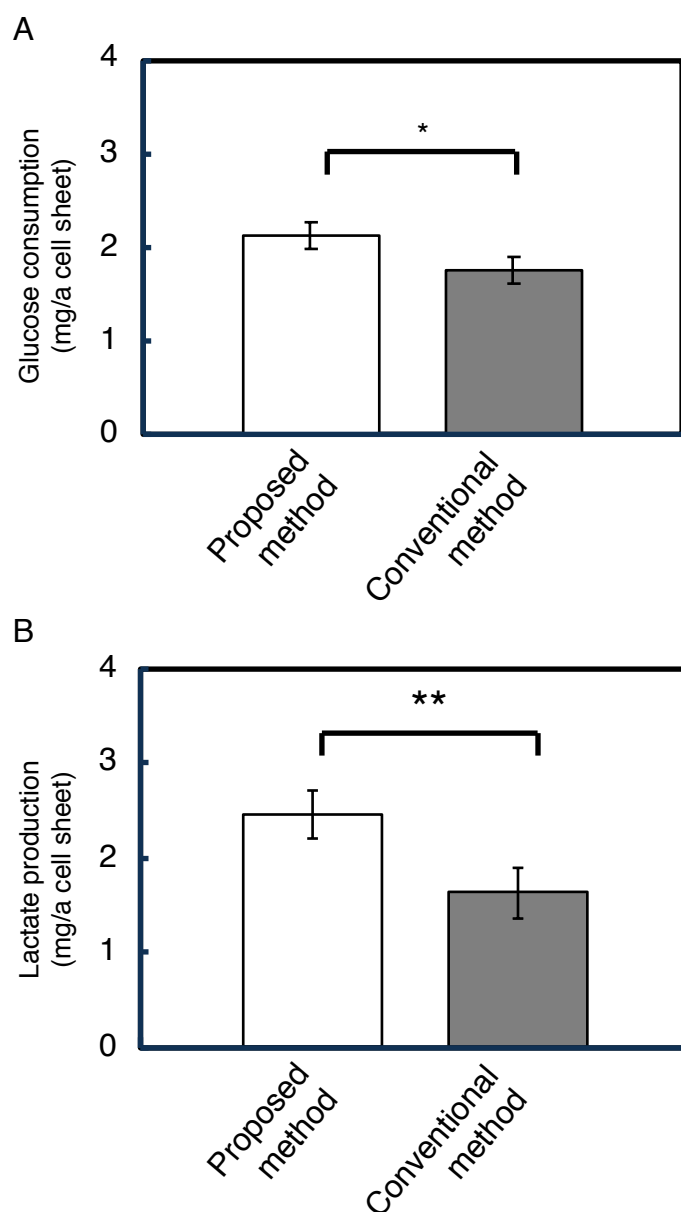


Figure 4-21. Results of cell sheet metabolism assays. (A) Glucose consumption and (B) lactate production after 24 h of culture (mean \pm SD, $n = 4$, $*p < 0.05$; $**p < 0.01$). Note that Mp and Mc represent the proposed and conventional methods, respectively. These assays were conducted after culturing cell sheets detached by each method for 24 h. Detached cell sheets were transferred to another culture dish and cultured with 2 mL culture medium. Finally, the supernatant was collected and monitored after 24 h of culture.

いることが伺える。4.7.2 項の結果から、今回ターゲットとしたタンパク質の発現量は剥離後 24 時間の間はいずれも変化がなかったが、さらに培養した際には、増殖性や生存率、サイトカインの析出量などの指標が改善される可能性がある。

本項から得られた知見と前項までに得られた知見を統合すると、本手法は、従来手法と比較して、機能性が高い細胞シートを、より低コストで生成できることがわかる。

4.8 提案手法の汎用性について

前項までで、直径 35 mm の汎用的な培養ディッシュを用いた際に、提案手法によって細胞シートが剥離されること、剥離される際の条件と剥離率、さらには剥離した細胞シートの機能性を報告した。本節では提案手法の応用可能性などを踏まえて、手法の汎用性について考察する。

4.8.1 細胞培養容器の汎用性について

前項まででは、汎用的な細胞培養容器として一種類の細胞培養ディッシュを用いた。このため、手法の汎用性には疑問が残る。そこで、手法の汎用性を示すために汎用的培養フラスコを用いた細胞シートの剥離を実行した。T25 フラスコ (90026, ビーエム機器株式会社) 内で細胞をコンフルエントまで培養して、直径 45 mm の振動面を有するランジュバン型振動子 (HEC-45402, 本多電子株式会社) を用いて、細胞シートの剥離を試みた。なお、本実験で T25 フラスコを振動子の上部に固定するために、アクリルを用いて治具を設計、製作した。本治具は振動子に対してシリコンゴムによって接着される。振動子とこれに接着した治具からなるデバイスを Figure 4-22 に示す。下記に実験方法を記す。

まず、前項までと異なるランジュバン型振動子を用いたため、固有振動数の測定を行った。固有振動数を測定する際には、振動子とフラスコの間を脱気した超純水で満たし、5 mL の培地を満たして 24 時間インキュベータに配置した後の T25 フラスコを配置した。なお、本測定においてはインピーダンスアナライザ (FRA5097, NF Corporation) を用いてランジュバン型振動子のインピーダンスを測定することによって共振周波数を測定した。この結果、ランジュバン型振動子に印加する交流電圧の周波数とインピーダンスの関係が Figure 4-23 に示すように得られた。同図から、本ランジュバン型振動子の固有振動数は 158.12 kHz 付近であることがわかった。

4.4.1 項の手順で培養した 1.0×10^7 個の細胞を 5 mL の増殖培地とともに汎用的な培養フラスコである T25 フラスコに播種した。その後、インキュベータ内に設置して 24 時間培養した。細胞がコンフルエントなモノレイヤーを構成したことを確認した後に、ランジュバン型振動子上のウォータチャンバに脱気した超純水を満たし、気泡が入らないように留意して

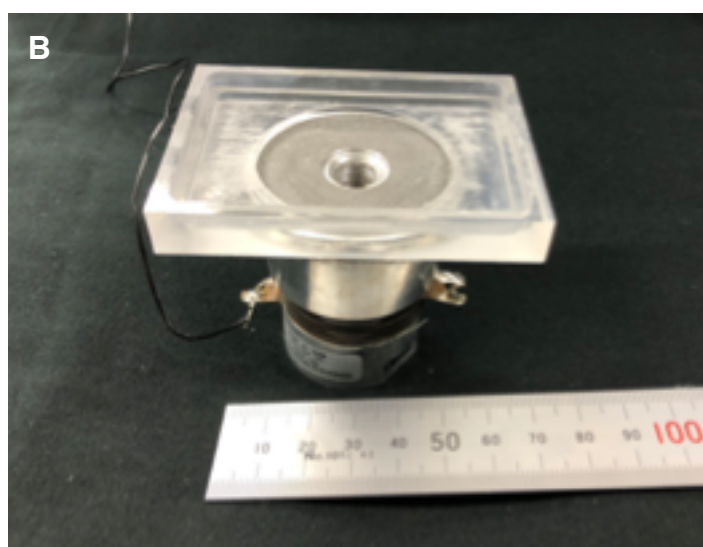
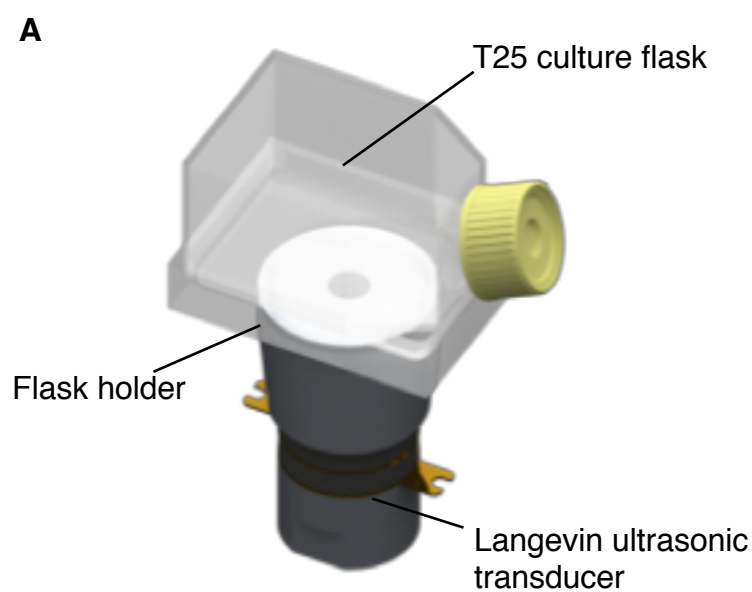


Figure 4-22. Overview of the cell detaching device. T25 flask is placed on the device via 14-mL water (A). Picture of the device (B).

フラスコを配置した。周波数 158.2 kHz~158.4 kHz の間を 100 ms でスイープした 87.5 V の交流電圧を振動子に印加することで、確実に振動子を共振させ、細胞シートの剥離を行った。本実験の結果を Figure 4-24 に示す。同図からわかるように、直径 35 mm のディッシュを用いた時と同様に周囲から徐々に細胞シートが剥離を開始し、最終的に一枚のシート状に剥離された。さらに、剥離した細胞シートの生死判定を行うためカルセイン染色を行った。染色の際には、細胞シートの剥離を確認したのちに、50 mL のピペットを電動ピペッターに装着し、細胞シートを破かないように慎重に吸引し、直径 60 mm の細胞培養ディッシュ (3010-060, 関谷理化株式会社) に移送した。その後、細胞シートの周囲にある培地を 1000 μ L チップと 1000 μ L ピペットを用いて除去し、インキュベータに入れて 60 分ほど培養することで細胞シートを培養面に接着させた。細胞シートが培養面に接着したことを確認したのちに、培養面を PBS で 2 回洗浄することで培地内の FBS に含まれる Ca を除去し、無血清培地 6 mL に 12 μ L の Calcein AM を混合した染色液を 6 mL ディッシュに導入してインキュベータ内で 30 分間インキュベートした。その後、染色液を除去し、培養面を PBS で洗浄し、無血

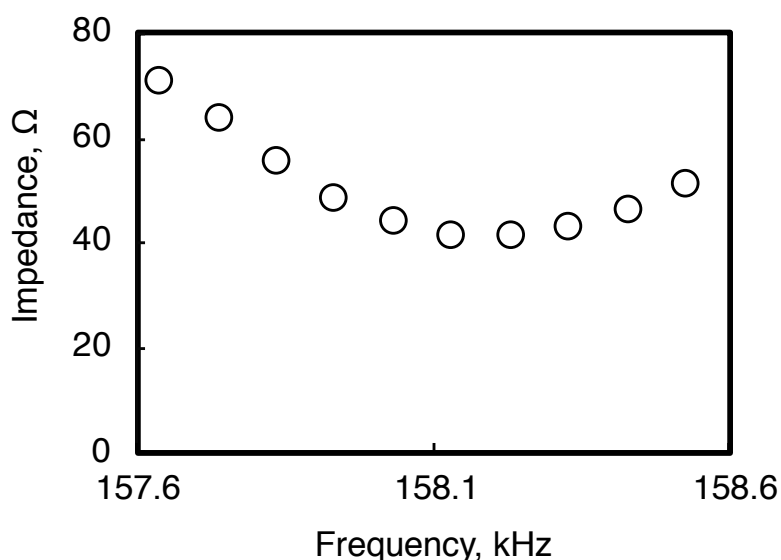


Figure 4-23 Relationship between input voltage frequency and impedance.

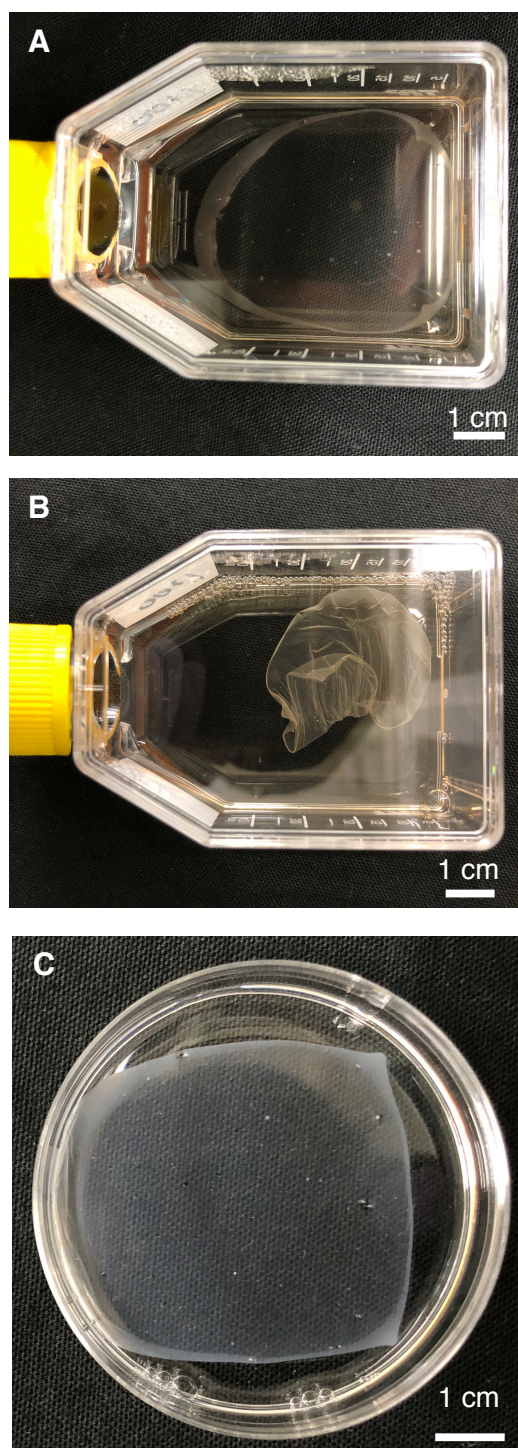


Figure 4-24 Cell sheet detachment from a T25 flask. (A) Appearance of the cell sheet being detached. (B) Cell sheet detached from the flask. (C) The detached cell sheet was transferred to a 60-mm dish to observe its morphology.

清培地で培養面を満たした。T25 フラスコから剥離した細胞シートは、直径 35 mm の培養ディッシュから剥離したものと比較して寸法が大きく、3.5.3 項や 4.6.1 項で用いた手法では撮影ができないため、シートの一部を撮影した。以上の手順で染色した生細胞を Figure 4-25 に示す。同図からわかるように、提案手法によって、T25 フラスコからも生細胞で構成された細胞シートを剥離できることが明らかになった。

上記の結果から、提案手法の培養容器に対する汎用性が伺える。このことで、他の技術との併用の可能性が広がる。例えば、1.4 節で紹介した細胞シートの剥離手法を本手法と組み合わせることによって、短時間で細胞シートを剥離できる可能性があり、医療の現場での急な需要にも対応できる可能性がある。さらに、1.3 節で紹介した細胞のパターニング技術とも組み合わせられる可能性がある。様々な方法でパターニングした細胞をシート状に剥離することで、より機能性の高い細胞シートの生成が期待できる。このように、提案手法のコンセプト

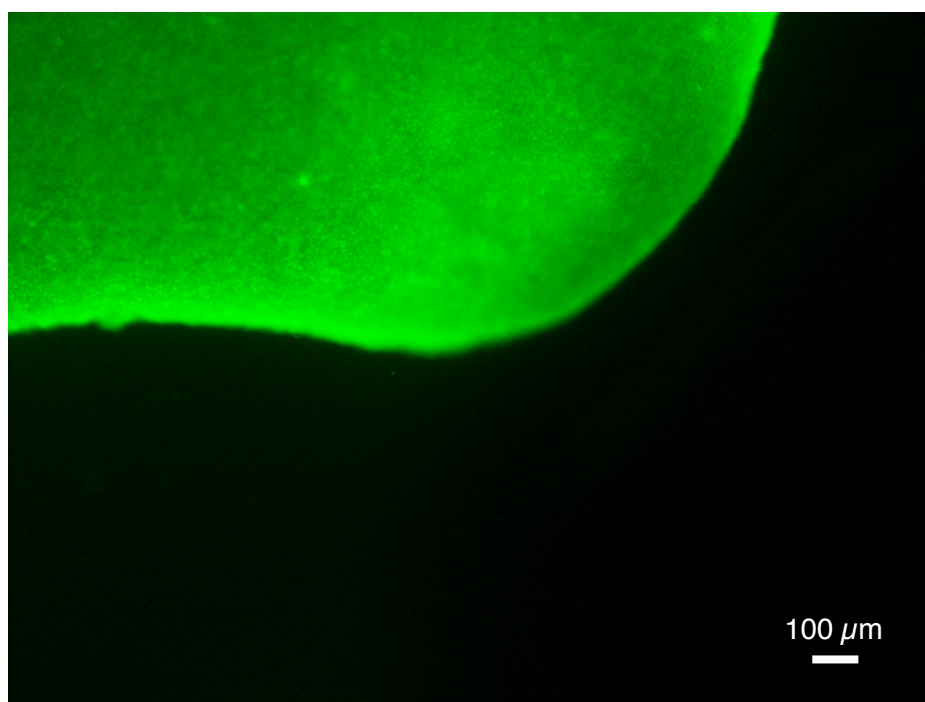


Figure 4-25 A corner of the cell sheet stained with calcein-AM to evaluate viability of the cell sheet. The staining indicated that the cell sheet consisted of live cells.

トを様々な培養容器および培養環境に適用することで、応用例が広がると考えられ、医療の発展につながると考えている。

さらに、筆者が調査した限りでは、従来手法を含め、酵素を用いない方法でフラスコから細胞シートを剥離した例は報告されていない。このことから、提案手法は細胞シートを剥離する手法の中で、細胞シートの普及に向けて最も高いポテンシャルを有していると言える。

4.8.2 細胞種の汎用性について

前項では、培養容器の汎用性について記したが、本項では細胞種の汎用性について考察する。今回の研究では、マウス由来筋芽細胞株 C2C12 のみを実験に用いた。提案手法では、超音波を用いて細胞に対して機械的な圧力を与えることで剥離している。これに対して、先行研究で紹介した細胞シートの剥離手法では、主に細胞の接着機構に着目して化学的な手法で細胞の接着を切断していた。接着機構は細胞種によって異なり、汎用性に対して疑問が持たれる¹⁷⁷。一方で、提案手法は細胞の接着機構に依存するような原理を用いておらず、細胞種に強く依存する手法ではないと考えられる。ただし、細胞同士の接着が弱い細胞や培養面に強く接着する細胞、さらには機械的な刺激に脆弱な細胞も存在すると考えられるため、実際に適用できる細胞については実験的に確認する必要がある。

一方で、前項で述べたように培養容器に対しての汎用性は示されている。このことから、従来手法である温度応答性培養ディッシュとも組み合わせることができると考えられる。温度応答性培養ディッシュを用いた従来手法のみでは細胞シートを生成できない種類の細胞も存在し、これらは低濃度のトリプシンを併用することで剥離が可能となっている (Figure 4-26 参照)。しかし、既述の通り、トリプシンなどのタンパク質分解酵素は ECM をはじめとする、細胞の機能を維持するタンパク質を分解する。提案手法と従来手法との組み合わせによって、これらの細胞種を用いた際も酵素フリーで細胞シートを生成できる可能性がある。また、温度の低下により大きな障害を受ける細胞もあるため、提案手法との組み合わせによって、細胞剥離に要する時間を短縮できる可能性もある。また、温度応答性培養ディッシュを用いて細胞シートを生成できる細胞種でも、細胞シートが剥離しない際は、手技によりディッシュの端を切り取ることが推奨されている。こういった手作業は生成される細胞シートの品質の均質化に影響を与える。提案手法を適用することで、手作業の必要性を最小限に抑制できる可能性がある。

4.9 小括

本章では、汎用的な培養容器から細胞シートを剥離する手法を報告した。まず、超音波を用いることで、接着した細胞を剥離できる可能性を指摘し(4.1節)、3章で提案、確立した振動の伝播手法に基づいて細胞シートを剥離するデバイスを設計、製作した(4.2節)。つぎに、製作したデバイスの振動特性や温度特性を評価した(4.3節)。さらに、4.4節で示した方法で、細胞シートの剥離実験を行い、その結果を示すとともに考察を加えた(4.5節)。剥離した細胞シートについて、4.6節で示した手法で評価を行い、その結果と考察を示した(4.7節)。最後に、手法の汎用性を確認すべく、4.7節までで使用していたディッシュ以外の細胞培養容器(T25 フラスコ)から細胞シートを剥離できることを示し、将来の展望を示した(4.8節)。



Figure 4-26 Cell species for cell sheet preparation

本研究では、超音波振動を用いることで、細胞をマニピュレートし、現状の細胞培養プロセスの問題点を解決する技術を開発することを目的とした。2章および3章においては、細胞を培養する際に細胞の位置関係を制御する細胞パターンニング方法を開発した。2章では、培養面にkHz帯の固有振動を励振することで生細胞を固有振動モードの節にパターンニングできることを明らかにした。3章では、減衰が少ないkHz帯の超音波を用いることで、汎用的な培養ディッシュに超音波を伝播し、細胞のパターンニングを行う手法を開発した。さらに、超音波による細胞パターンニングの生体適合性を示した。最後に、4章では培養した細胞を超音波によって培養容器から細胞シートとして回収する手法を開発した。さらに、剥離した細胞シートは従来の手法で剥離したものと比較して、機能性は同等で代謝が優れていることを明らかにした。すなわち、2章でkHz帯の超音波によって細胞をマニピュレートできることを確認し、3章で超音波を汎用培養容器に伝播する方法を開発し、これに立脚して、4章で超音波を汎用培養容器に伝播することで細胞シートを剥離する方法を確立した。以下に本研究で得られた知見をまとめる。

培養基材の固有振動モードを用いた細胞パターンニング

細胞を播種する培養面に効率的に固有振動を励振するために、有限要素法を用いて培養面の固有振動モードを解析した。求めた固有振動モードを励振できる培養面およびこれを組み込んだ細胞パターンニングデバイスを設計、製作した。このデバイスに細胞を播種し、振動を励振した。これにより細胞を固有振動モードの節にパターンニングし、接着した生細胞の密度分布を測定した。なお、本実験では、プライマリーな接着性細胞である仔ウシ由来の軟骨細

胞を用いた。この結果として、以下の知見を得た。

- 機械的 Q 値が高く、固有振動を効率的に励振できる金属基材の中で生体適合性が高い SUS316L を培養面として用いる事とし、固有値解析によって培養面に励振する固有振動を解析した。培養面と圧電素子から構成された培養基材に対して、圧電-構造連成解析を実施することによって、効率的に固有振動モードを励振できることを明らかにした。また、圧電素子に印加する交流信号の周波数を適切に調整することで、円状の節を 1 つ有する固有振動モードと、円および十字状の節を併せ持つ固有振動モードを選択的に励振できることを明らかにした。
- 設計した培養基材を有する細胞パターンングデバイスを製作し、培養基材に所望の固有振動モードを励振できることをレーザドップラ振動計を用いて確認した。
- 細胞パターンングデバイスに対して接着性細胞を播種し、この直後からそれぞれの固有振動モードを励振して細胞が接着する分布を測定した。なお、励振する固有振動の振幅はそれぞれ 3 水準で実験を行なった。この結果、いずれの固有振動モードを用いた際も、至適な振幅において生細胞をパターンングできることが明らかになった。
- 本手法でパターンングした細胞の培養面上における密度は、その位置における振動振幅の大きさととの間に一次関数で表される関係があることが明らかになった。さらに、細胞の培養面に対する接着を抑制する振動振幅に、振動数ごとの閾値があることが明らかになった。
- 過大な振幅は細胞を破砕することが明らかになった。さらに、振幅が大きくなると培地内に音響流と呼ばれる流動が発生し、本コンセプトによる細胞のパターンングを阻害することが明らかになった。

汎用培養ディッシュ内における超音波を用いた細胞パターンング

汎用的な細胞培養ディッシュ内において、超音波を用いた細胞パターンングを実行するため、ディッシュに対して超音波振動を伝播するデバイスを製作した。これを用いてパターンングした細胞を 5 日間培養し、超音波が細胞に与える影響を明らかにした。なお、接着性細胞であるマウス由来筋芽細胞株 C2C12 を用いて実験を行なった。この結果として、以下の知見を得た。

- 振動子と培養ディッシュの間にグリセロールを挿入する構造を提案し、この構造により振動子から照射された超音波が効率的にディッシュ内に伝播することを確認した。
- 直径 35 mm の培養ディッシュを用いて、研究のコンセプトを示すこととし、これに合わ

せて細胞パターンングデバイスを設計した。設計したデバイスは超音波振動子を有しており、この振動子は SUS316L の円板と圧電素子から構成されている。SUS316L の円板に対して固有値解析を行い、励振する固有振動モードを決定した。決定した固有振動モードを励振できる位置に圧電素子を配置し、圧電-構造連成解析を用いて効率的に固有振動モードを励振できることを明らかにした。この結果、圧電素子に印加する交流電圧の周波数を選択することで円状の節を 1 つ有する固有振動モードと、円および直線状の節を併せ持つ固有振動モードを選択的に励振できることを明らかにした。

- 設計したデバイスを製作し、振動子に所望の固有振動モードを励振できることを確認した。汎用ディッシュ内において、振動子に励振した各固有振動モードの節に生細胞をパターンングできることを明らかにした。本手法でパターンングした細胞の培養面上における密度は、その位置における振動振幅の大きさとの間に一次関数で表される関係があることを明らかにした。さらに、細胞の培養面に対する接着を抑制する振動振幅に、振動数ごとの閾値があることを明らかにした。
- 円状の節を 1 つ有する固有振動モードによってパターンングした細胞を長期培養し、その増殖性、タンパク質発現などに異常がないことを確認した。パターンングした細胞は細胞の自己収縮によって 3 次元化がされることがわかった。

超音波による汎用培養容器からの細胞シートの剥離

汎用的な細胞培養容器を用いて、超音波による細胞シートの剥離を実行するため、ディッシュおよびフラスコに対して超音波振動を伝播するデバイスを製作し、これを用いて細胞シートの剥離を試みた。細胞シートを剥離するための条件を検討するとともに、剥離した細胞シートの機能性を確認した。なお、細胞シートの研究において一般に用いられるマウス由来筋芽細胞株 C2C12 を用いて本研究のコンセプトを確認した。この結果として、以下の知見を得た。

- 直径 35 mm の培養ディッシュ、および T25 フラスコの底面に対して、均一な超音波を照射するデバイスを設計、製作した。
- 至適な振動振幅を有する超音波を照射することで、従来手法と同等の剥離効率で、直径 35 mm の培養ディッシュから細胞シートを剥離できることを明らかにした。さらに、他の手法では前例がない T25 フラスコからの細胞シートの剥離を実現した。これらの細胞シートは生細胞から構成されていることを確認した。
- 直径 35 mm の培養ディッシュから剥離した細胞シートの機能性を確認した。この結果、剥離直後の細胞シートに形態の異常がないこと、および細胞シートが細胞外マトリクス

を有していることを明らかにした。さらに、剥離した細胞シートを24時間培養した後の細胞シートの機能性を従来手法で剥離した細胞シートと比較した。この結果、提案手法によって細胞シートの代謝が向上し、タンパク質発現には異常がないことを明らかにした。

以上に示したように、本研究では超音波を用いることで細胞培養に資する細胞マニピュレーション技術を確立した。細胞のパターニングおよび細胞シートの剥離は、これまでも様々な技術を用いて試みられてきたが、従来の技術はいずれも特殊な培養容器や添加物を必要としていた。しかし、本研究で確立した手法は、汎用的な培養環境に対して適用することが容易であり、医療への応用も比較的容易である。また、本研究では特定の種類の培養容器を用いて手法を確立したが、培養容器が超音波振動子の振動特性に与える影響は軽微である。このため、他の種類の培養容器に対して応用する際には、出力を調整する必要があるものの、本研究で確立した手法は特定の種類の培養容器に限定されない。このように、本研究が細胞を用いた医療の発展に寄与することが期待できる。

謝辞

本研究を行うにあたり、本当に多くの方々に支えて頂きました。ここに感謝の意を表します。とくに、指導教員である慶應義塾大学理工学部機械工学科の竹村研治郎教授には、多大なるご指導を賜りました。研究にとどまらず、研究者・教育者としての在り方など、多くの貴重なことがらに対するご指導は非常に貴重なものでした。本論文の審査過程において副査をお務め頂きました泰岡顕治教授、尾上弘晃准教授、安藤景太准教授には、多くのご指導をいただきました。深く感謝申し上げます。

本研究に対するご助言に限らず、平素よりご指導いただきました慶應義塾大学理工学部機械工学科の小茂鳥潤教授、杉浦壽彦教授、宮田昌悟准教授、尾上弘晃准教授、生命情報学科の舟橋啓准教授、システムデザイン工学科の須藤亮准教授、山下忠紘助教、東京工業大学物質理工学院の倉科佑太助教に深く御礼申し上げます。

また、留学を含めて継続的にご指導頂きました University of California, San Diego の James Friend 教授と Yonsei University の Hyungsuk Lee 講師に心より感謝致します。

所属する博士課程教育リーディングプログラムであるグローバル環境システムリーダープログラムから多大なるご支援を頂きました。理工学部の植田利久名誉教授、泰岡顕治教授、深淵康二教授、三上益弘訪問教授、浅井誠准教授、政策・メディア研究科の倉林修一講師、Brawijaya University の Wresti L. Anggayasti 講師およびリーディング事務局の皆様にはプログラムの遂行に関して大変お世話になりました。

学術研究支援課を始めとした事務の皆様のおかげがあり、研究活動を始めた大学での生活を送ることができました。

竹村研究室、小茂鳥研究室、杉浦研究室、宮田研究室、尾上研究室、安藤研究室、舟橋研究室、須藤研究室の皆様は、いつも相談に乗って下さいました。グローバル環境システムリーダープログラムの諸先輩方、同輩や後輩諸君とのディスカッションは刺激的でした。こういったコミュニティの同輩には精神的にも支えて頂きました。

成蹊大学の戸谷希一郎教授、栗原大輝助教、安田女子大学の平野真講師、長岡技術科学大学の大沼清准教授のご指導がなければ、学際的研究を行うことはできませんでした。

研究を遂行するにあたって、経済的ご支援を頂いた、日本学術振興会、独立行政法人日本学生支援機構、石井石橋基金、博士課程学生研究支援プログラムの関係者の皆様に感謝致します。

最後に、常に支えになってくれた両親、祖母と妻の美紗に感謝します。

2019年5月研究室にて

今城哉裕

参考文献

1. Parmar, N., Kumar, L., Emmanue, A.. & Richard, M. D. Prospective regenerative medicine therapies for obstetric trauma-induced fecal incontinence. *Regen. Med.* **9**, 831–840 (2014).
2. Nicolas, C. T. *et al.* Concise Review: Liver Regenerative Medicine: From Hepatocyte Transplantation to Bioartificial Livers and Bioengineered Grafts. *Stem Cells* 42–50 (2016).
3. 日本PDA製薬学会 バイオウイルス委員会, ”バイオ医薬品ハンドブック 第2版 ~Biologicsの製造から品質管理まで~, ”株式会社じほう, 2016.
4. 乾賢一 (監修), 赤池昭紀 (編集), 長船健二 (編集), 直江知樹 (編集), 濱田哲暢 (編集), ”バイオ医薬品と再生医療 (臨床薬学テキストシリーズ), ”中山書店, 2016.
5. 赤路健一, 林良雄, 津田裕子, ”ベーシック創薬化学, ”化学同人, 2014.
6. 医薬品非臨床試験ガイドライン研究会, ”医薬品非臨床試験ガイドライン解説. 2010, ”薬事日報社, 2010.
7. Hübner, G. E., Koch, R. C., Sprenger, K. B., Stadler, P. J. & Gölker, C. F. Examination of the biological safety of a drug derived from mammalian organs. *Arzneimittelforschung.* **46**, 657–661 (1996).
8. Hawkes, P. W. Fetal bovine serum: geographic origin and regulatory relevance of viral contamination. *Bioresour. Bioprocess.* **2**, 34 (2015).
9. Park, J. H., Ushida, T. & Akimoto, T. Control of cell differentiation by mechanical stress. *J. Phys. Fit. Sport. Med.* **2**, 49–62 (2013).
10. Paluch, E. K. *et al.* Mechanotransduction: use the force(s). *BMC Biol.* 1–14 (2015).
11. Paul, S. M. *et al.* How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry’s grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 203–214 (2010).
12. Kimmelman, J., Mogil, J. S. & Dirnagl, U. Distinguishing between Exploratory and Confirmatory Preclinical Research Will Improve Translation. *PLOS Biol.* **12**, (2014).
13. Sun, W. *et al.* Organ-on-a-Chip for Cancer and Immune Organs Modeling. *Adv. Healthc. Mater.* 1–12 (2019).
14. Kramer, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat. Res. Mutat. Res.* **752**, 10–24 (2013).
15. Mironov, V., Prestwich, G. & Forgacs, G. Bioprinting living structures. *J. Mater. Chem.* **17**, 2054–2060 (2007).
16. Koppanyi, T. & Avery, M. A. Species differences and the clinical trial of new drugs: A review. *Clin. Pharmacol. Ther.* **7**, 250–270 (1966).
17. Hartung, T. Thoughts on limitations of animal models. *Park. Relat. Disord.* **14**, 81–83 (2008).
18. Esch, E. W., Bahinski, A. & Huh, D. Organs-on-chips at the frontiers of drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **14**, 248–260 (2015).
19. Polak-Charcon, S., Hekmati, M. & Ben-Shaul, Y. The effect of modifying the culture medium on cell polarity in a human colon carcinoma cell line. *Cell Differ. Dev.* **26**, 119–129 (1989).
20. Lawius, J. A. & Biggers, J. D. Overcoming the 2-Cell Block by Modifying Standard

- Components in a Mouse Embryo Culture Medium. *Biol. Reprod.* **45**, 245–251 (1991).
21. 大藤道衛, ”バイオ実験超基本Q&A : 意外に知らない、いまさら聞けない, ”羊土社, 2010.
 22. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science (80-.)*. **260**, 920–926 (1993).
 23. Mason, C. & Manzotti, E. Regenerative medicine cell therapies: numbers of units manufactured and patients treated between 1988 and 2010. *Regen. Med.* **5**, 307–313 (2010).
 24. 井家益和. 自家培養表皮ジェイス®を用いた熱傷治療. *創傷* **3**, 118–123 (2014).
 25. Rheinwald, J. G. & Green, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* **6**, 331–343 (1975).
 26. Inoie, M. & Ozawa, Y. Autologous cultured epidermis: industrialization of regenerative medicine. *Folia Pharmacol. Jpn.* **137**, 150–153 (2011).
 27. O’Connor, N., Mulliken, J., Banks-Schlegel, S., Kehinde, O. & Green, H. Grafting Of Burns With Cultured Epithelium Prepared From Autologous Epidermal Cells. *Lancet* **317**, 75–78 (1981).
 28. 越智 光夫 & 亀井 直輔. 軟骨細胞による再生医療. *臨床整形外科* **12**, 1154–1155 (2015).
 29. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
 30. Kim, D.-S. *et al.* Robust Enhancement of Neural Differentiation from Human ES and iPS Cells Regardless of their Innate Difference in Differentiation Propensity. *Stem Cell Rev. Reports* **6**, 270–281 (2010).
 31. Sommer, C. A. *et al.* Excision of Reprogramming Transgenes Improves the Differentiation Potential of iPS Cells Generated with a Single Excisable Vector. *Stem Cells* **28**, 64–74 (2009).
 32. Zhang, D. *et al.* Highly efficient differentiation of human ES cells and iPS cells into mature pancreatic insulin-producing cells. *Cell Res.* **19**, 429–438 (2009).
 33. Darabi, R. *et al.* Functional Myogenic Engraftment from Mouse iPS Cells. *Stem Cell Rev. Reports* **7**, 948–957 (2011).
 34. Abad, M. *et al.* Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* **502**, 340–345 (2013).
 35. Masumoto, H. *et al.* Human iPS cell-engineered cardiac tissue sheets with cardiomyocytes and vascular cells for cardiac regeneration. *Sci. Rep.* **4**, 1–7 (2015).
 36. Mandai, M. *et al.* Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1038–1046 (2017).
 37. Kikuchi, T. *et al.* Human iPS cell-derived dopaminergic neurons function in a primate Parkinson’s disease model. *Nature* **548**, 592–596 (2017).
 38. Kurashina, Y. *et al.* Enzyme-free cell detachment mediated by resonance vibration with temperature modulation. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 2279–2288 (2017).
 39. Huang, H.L. *et al.* Trypsin-induced proteome alteration during cell subculture in mammalian cells. *J. Biomed. Sci.* **17**, 1–10 (2010).

40. Hemmi, N. *et al.* A massive suspension culture system with metabolic purification for human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Stem Cells Transl. Med.* **3**, 1473–83 (2014).
41. Ram, S., Vedula, K., Ravasio, A., Lim, C. T. & Ladoux, B. Collective Cell Migration: A Mechanistic Perspective. *Physiology* **28**, 370–379 (2013).
42. Ota, M. & Sasaki, H. Mammalian Tead proteins regulate cell proliferation and contact inhibition as transcriptional mediators of Hippo signaling. *Development* **135**, 4059–4069 (2008).
43. Kurashina, Y., Hamano, T., Miyata, S., Komotori, J. & Koyama, T. Proliferation of Calf Chondrocyte on Stainless Steel Surfaces with Different Microtopography. *J. Japan Inst. Met. Mater.* **78**, 170–176 (2014).
44. Charge, S. B. & Rudnicki, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* **84**, 209–238 (2004).
45. Wozniak, M. A., Modzelewska, K., Kwong, L. & Keely, P. J. Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1692**, 103–119 (2004).
46. Rørth, P. Collective Cell Migration ECM: extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **25**, 407–429 (2009).
47. Akhtar, N. & Streuli, C. H. Rac1 links integrin-mediated adhesion to the control of lactational differentiation in mammary epithelia. *J. Cell Biol.* **173**, 781–793 (2006).
48. Li, S. Y., Mruk, D. D. & Cheng, C. Y. Focal adhesion kinase is a regulator of F-actin dynamics: New insights from studies in the testis. *Spermatogenesis* **3**, e25385 (2013).
49. Friedl, P. & Mayor, R. Tuning Collective Cell Migration by Cell – Cell Junction Regulation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 1–18 (2017).
50. Bazellières, E. *et al.* Control of cell-cell forces and collective cell dynamics by the intercellular adhesome Europe PMC Funders Group. *Cell Biol. Nat Cell Biol* **17**, 409–420 (2015).
51. Zeiger, A. S., Loe, F. C., Li, R., Raghunath, M. & Van Vliet, K. J. Macromolecular Crowding Directs Extracellular Matrix Organization and Mesenchymal Stem Cell Behavior. *PLoS One* **7**, e37904 (2012).
52. Ajeti, V., Lara-Santiago, J., Alkmin, S. & Campagnola, P. J. Ovarian and Breast Cancer Migration Dynamics on Laminin and Fibronectin Bi-directional Gradient Fibers Fabricated via Multiphoton Excited Photochemistry. *Cell. Mol. Bioeng.* **10**, 295–311 (2017).
53. Singh, P., Carraher, C. & Schwarzbauer, J. E. Assembly of fibronectin extracellular matrix. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **26**, 397–419 (2010).
54. Vega, M. E., Schwarzbauer, J. E., Yamada, K. M. & Mayor, R. Collaboration of fibronectin matrix with other extracellular signals in morphogenesis and differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **42**, 1–6 (2016).
55. Brittberg, M. *et al.* Treatment of Deep Cartilage Defects in the Knee with Autologous Chondrocyte Transplantation. *N. Engl. J. Med.* **331**, 889–895 (1994).
56. Ochi, M. *et al.* Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. *J Bone Joint Surg* **84**, (2002).
57. 木村浩彰, 永富彰仁, 三上幸夫. 平田和彦牛尾会. 膝軟骨の再生医療. 総合リハビリ

- テーション **42**, 401–407 (2014).
58. Hasegawa, A., Haraguchi, Y., Shimizu, T. & Okano, T. Rapid fabrication system for three-dimensional tissues using cell sheet engineering and centrifugation. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **103**, 3825–3833 (2015).
 59. Tadakuma, K. *et al.* A device for the rapid transfer/transplantation of living cell sheets with the absence of cell damage. *Biomaterials* **34**, 9018–9025 (2013).
 60. Asakawa, N. *et al.* Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering. *Biomaterials* **31**, 3903–3909 (2010).
 61. Masuda, S., Shimizu, T., Yamato, M. & Okano, T. Cell sheet engineering for heart tissue repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 277–285 (2008).
 62. Yang, J. *et al.* Cell sheet engineering: Recreating tissues without biodegradable scaffolds. *Biomaterials* **26**, 6415–6422 (2005).
 63. Lam, M. T., Sim, S., Zhu, X. & Takayama, S. The effect of continuous wavy micropatterns on silicone substrates on the alignment of skeletal muscle myoblasts and myotubes. *Biomaterials* **27**, 4340–4347 (2006).
 64. Ho, C.-T. *et al.* Liver-cell patterning Lab Chip: mimicking the morphology of liver lobule tissue. *Lab Chip* **13**, 3578–3587 (2013).
 65. Liu, Y. *et al.* In Vitro Construction of Scaffold-Free Bilayered Tissue-Engineered Skin Containing Capillary Networks. *Biomed Res. Int.* **8**, (2013).
 66. Lukashev, M. E. & Werb, Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* **8**, 437–441 (1998).
 67. Cooke, M. J. *et al.* Enhanced cell attachment using a novel cell culture surface presenting functional domains from extracellular matrix proteins. *Cytotechnology* **56**, 71–79 (2008).
 68. Pan, Y., Du, X., Zhao, F. & Xu, B. Magnetic nanoparticles for the manipulation of proteins and cells. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 2912–2942 (2012).
 69. Souza, G. R. *et al.* Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat. Nanotechnol.* **5**, 291–296 (2010).
 70. Yamamoto, Y. *et al.* Preparation of artificial skeletal muscle tissues by a magnetic force-based tissue engineering technique. *J. Biosci. Bioeng.* **108**, 538–543 (2009).
 71. Kim, E., Yoo, S.-J., Moon, C., Nelson, B. J. & Choi, H. SU-8-based nanoporous substrate for migration of neuronal cells. *Microelectron. Eng.* **141**, 173–177 (2015).
 72. Bhatia, S. N., Yarmush, M. L. & Toner, M. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: Hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* **34**, 189–199 (1997).
 73. Guo, F. *et al.* Reusable acoustic tweezers for disposable devices. *Lab Chip* **15**, 4517–4523 (2015).
 74. Bernassau, A. L. *et al.* Controlling acoustic streaming in an ultrasonic heptagonal tweezers with application to cell manipulation. *Ultrasonics* **54**, 268–274 (2014).
 75. Gesellchen, F., Bernassau, A. L., Déjardin, T., Cumming, D. R. S. & Riehle, M. O. Cell patterning with a heptagon acoustic tweezer - application in neurite guidance. *Lab Chip* **19**,

- 2266–2275 (2014).
76. Okano, T., Yamada, N., Okuhara, M., Sakai, H. & Sakurai, Y. Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces. *Biomaterials* **16**, 297–303 (1995).
 77. Xuequan, L., Maolin, Z., Jiuqiang, L. & Hongfei, H. Radiation preparation and thermo-response swelling of interpenetrating polymer network hydrogel composed of PNIPAAm and PMMA. *Radiat. Phys. Chem.* **57**, 477–480 (2000).
 78. Yun, J. & Kim, H.-I. Dual-responsive release behavior of pH-sensitive PVA/PAAc hydrogels containing temperature-sensitive PVA/PNIPAAm microcapsules. *Polym. Bull.* **68**, 1109–1119 (2012).
 79. Okano, T., Yamada, N., Sakai, H. & Sakurai, Y. A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide). *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 1243–1251 (1993).
 80. Yamato, M. & Okano, T. Cell sheet engineering. *Mater. Today* **7**, 42–47 (2004).
 81. Miyagawa, S. *et al.* Phase I Clinical Trial of Autologous Stem Cell-Sheet Transplantation Therapy for Treating Cardiomyopathy. *J. Am. Heart Assoc.* **6**, (2017).
 82. Sawa, Y. *et al.* Safety and Efficacy of Autologous Skeletal Myoblast Sheets (TCD-51073) for the Treatment of Severe Chronic Heart Failure Due to Ischemic Heart Disease. *Circ. J.* **79**, 991–999 (2015).
 83. Fujita, B. & Zimmermann, W.-H. Myocardial Tissue Engineering for Regenerative Applications. *Curr Cardiol Rep* **19**, 1–10 (2017).
 84. Kaufmann, H., Mazur, X., Fussenegger, M. & Bailey, J. E. Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells. *Biotechnol. Bioeng.* **63**, 573–582 (1999).
 85. Sonna, L. A., Fujita, J., Gaffin, S. L. & Lilly, C. M. Invited review: Effects of heat and cold stress on mammalian gene expression. *J. Appl. Physiol.* **92**, 1725–1742 (2002).
 86. Gregory, C. D. & Milner, A. E. Regulation of cell survival in burkitt lymphoma: implications from studies of apoptosis following cold-shock treatment. **426**, 419–426 (1994).
 87. Kwon, O. H., Kikuchi, A., Yamato, M., Sakurai, Y. & Okano, T. Rapid cell sheet detachment from poly(N-isopropylacrylamide)-grafted porous cell culture membranes. *J. Biomed. Mater. Res.* **50**, 82–89 (2000).
 88. Patel, N. G. & Zhang, G. Responsive systems for cell sheet detachment. *Organogenesis* **9**, 93–100 (2013).
 89. Enomoto, J. *et al.* Engineering thick cell sheets by electrochemical desorption of oligopeptides on membrane substrates. *Regen. Ther.* **3**, 24–31 (2016).
 90. Inaba, R., Khademhosseini, A., Suzuki, H. & Fukuda, J. Electrochemical desorption of self-assembled monolayers for engineering cellular tissues. *Biomaterials* **30**, 3573–3579 (2009).
 91. Yoon, S.-H. & Mofrad, M. R. K. Cell adhesion and detachment on gold surfaces modified with a thiol-functionalized RGD peptide. *Biomaterials* **32**, 7286–7296 (2011).

92. Enomoto, J. *et al.* Engineering thick cell sheets by electrochemical desorption of oligopeptides on membrane substrates. *Regen. Ther.* **3**, 24–31 (2016).
93. Kim, M. S. *et al.* Homogeneity evaluation of mesenchymal stem cells based on electrotaxis analysis. *Sci. Rep.* **7**, 1-10 (2017).
94. Lo, K.-Y., Wu, S.-Y. & Sun, Y.-S. A microfluidic device for studying the production of reactive oxygen species and the migration in lung cancer cells under single or coexisting chemical/electrical stimulation. *Microfluid. Nanofluidics* **20**, 1-11 (2016).
95. Zahn, R., Thomasson, E., Guillaume-Gentil, O., Vörös, J. & Zambelli, T. Ion-induced cell sheet detachment from standard cell culture surfaces coated with polyelectrolytes. *Biomaterials* **33**, 3421–3427 (2012).
96. Guillaume-Gentil, O. *et al.* Polyelectrolyte Coatings with a Potential for Electronic Control and Cell Sheet Engineering. *Adv. Mater.* **20**, 560–565 (2008).
97. Hong, Y. *et al.* Light-induced cell detachment for cell sheet technology. *Biomaterials* **34**, 11–18 (2013).
98. Akiyama, H., Ito, A., Kawabe, Y. & Kamihira, M. Genetically engineered angiogenic cell sheets using magnetic force-based gene delivery and tissue fabrication techniques. *Biomaterials* **31**, 1251–1259 (2010).
99. Ito, A., Ino, K., Kobayashi, T. & Honda, H. The effect of RGD peptide-conjugated magnetite cationic liposomes on cell growth and cell sheet harvesting. *Biomaterials* **26**, 6185–6193 (2005).
100. Ohnuma, K. *et al.* Enzyme-free passage of human pluripotent stem cells by controlling divalent cations. *Sci. Rep.* **4**, 1-7 (2014).
101. Mould, P. & Humphries, M. J. Regulation of integrin $\alpha 5\beta 1$ -fibronectin interactions by divalent cations: Evidence for distinct classes of binding sites for Mn^{2+} , Mg^{2+} , and Ca^{2+} . *Artic. J. Biol. Chem.* **270**, 26270–26277 (1995).
102. Braam, S. R. *et al.* Recombinant Vitronectin Is a Functionally Defined Substrate That Supports Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal via $\alpha V\beta 5$ Integrin. *Stem Cells* **26**, 2257–2265 (2008).
103. Rowland, T. J. *et al.* Roles of Integrins in Human Induced Pluripotent Stem Cell Growth on Matrigel and Vitronectin. *Stem Cells Dev.* **19**, 1231–1240 (2010).
104. Hayashi, Y. *et al.* Reduction of N-Glycolylneuraminic Acid in Human Induced Pluripotent Stem Cells Generated or Cultured under Feeder- and Serum-Free Defined Conditions. *PLoS One* **5**, e14099 (2010).
105. Friend, J. & Yeo, L. Y. Microscale acoustofluidics: Microfluidics driven via acoustics and ultrasonics. *Rev. Mod. Phys.* **83**, 647–704 (2011).
106. Gedge, M. & Hill, M. Acoustofluidics 17: Theory and applications of surface acoustic wave devices for particle manipulation. *Lab Chip* **12**, 2998–3007 (2012).
107. Tanaka, E., Nagata, K. & Kawai, N. Application of LIPUS to Skeletal Muscles. *Therapeutic Ultrasound in Dentistry* 27–34 (2018).
108. Marmottant, P. & Hilgenfeldt, S. Controlled vesicle deformation and lysis by single oscillating

- bubbles. *Nature* **423**, 153–156 (2003).
109. Shah, A. *et al.* Novel ultrasound method to reposition kidney stones. *Urol. Res.* **38**, 491–495 (2010).
 110. Brennen, C. E. Cavitation in medicine. *Interface Focus* **5**, 1-12 (2015).
 111. Iwasaki, H., Uesato, R. & Ishibashi, Y. Clinical Experience of Low-Intensity Pulsed Ultrasound (LIPUS) in Scaphoid Fracture. *J. Orthop. Trauma* **32**, S4 (2018).
 112. Iwashina, T. *et al.* Low-intensity pulsed ultrasound stimulates cell proliferation and proteoglycan production in rabbit intervertebral disc cells cultured in alginate. *Biomaterials* **27**, 354–361 (2006).
 113. Vira, D. *et al.* Cancer stem cells, microRNAs, and therapeutic strategies including natural products. *Cancer Metastasis Rev.* **31**, 733–751 (2012).
 114. Cosgrove, B. D. *et al.* N-cadherin adhesive interactions modulate matrix mechanosensing and fate commitment of mesenchymal stem cells. *Nat. Mater.* **15**, 1297–1307 (2016).
 115. Hino, H., Hashimoto, S., Takahashi, Y. & Nakajima, H. Effect of Ultrasonic Vibration on Proliferation and Differentiation of Cells. in *Proceedings of The 20th World Multi-Conference on Systemics, Cybernetics and Informatics (WMSCI 2016)* 111–116 (2016).
 116. Salgarella, A. R. *et al.* Optimal Ultrasound Exposure Conditions for Maximizing C2C12 Muscle Cell Proliferation and Differentiation. *Ultrasound Med. Biol.* **43**, 1452–1465 (2017).
 117. Ikeda, K. *et al.* Effects of low-intensity pulsed ultrasound on the differentiation of C2C12 cells. *Life Sci.* **79**, 1936–1943 (2006).
 118. Choi, Y. K., Cho, H., Seo, Y. K., Yoon, H. H. & Park, J. K. Stimulation of sub-sonic vibration promotes the differentiation of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into neural cells. *Life Sci.* **91**, 329–337 (2012).
 119. Cho, H. *et al.* Neural differentiation of umbilical cord mesenchymal stem cells by sub-sonic vibration. *Life Sci.* **90**, 591–599 (2012).
 120. Stamp, M. E. M., Brugger, M. S., Wixforth, A. & Westerhausen, C. Acoustotaxis – in vitro stimulation in a wound healing assay employing surface acoustic waves. *Biomater. Sci.* **4**, 1092–1099 (2016).
 121. Sakurai, H., Kawabata, K., Sakurai, F., Nakagawa, S. & Mizuguchi, H. Innate immune response induced by gene delivery vectors. *Int. J. Pharm.* **354**, 9–15 (2008).
 122. Zuris, J. A. *et al.* Cationic lipid-mediated delivery of proteins enables efficient protein-based genome editing in vitro and in vivo. *Nat. Biotechnol.* **33**, 73–80 (2015).
 123. Meng, L. *et al.* On-chip targeted single cell sonoporation with microbubble destruction excited by surface acoustic waves. *Appl. Phys. Lett.* **104**, 1-5 (2014).
 124. Carugo, D. *et al.* Contrast agent-free sonoporation: The use of an ultrasonic standing wave microfluidic system for the delivery of pharmaceutical agents. *Biomicrofluidics* **5**, 1–15 (2011).
 125. Dentry, M. B., Yeo, L. Y. & Friend, J. R. Frequency effects on the scale and behavior of acoustic streaming. *Phys. Rev. E - Stat. Nonlinear, Soft Matter Phys.* **89**, 1–11 (2014).
 126. Yosioka, K., Kawasima, Y. Acoustic radiation pressure on a compressible sphere. *J. Fluid Mech.*

- 267, 1-22 (1955).
127. 黒田道雄, “機械振動学,” 四方堂書店, 2000.
 128. 琵琶哲志, “熱音響デバイス,” 日本音響学会, 2018.
 129. Kikuchi, S., Kameyama, Y., Mizutani, M. & Komotori, J. Effects of Fine Particle Peening on Oxidation Behavior of Nickel - Titanium Shape Memory Alloy. *Mater. Trans.* **55**, 176–181 (2014).
 130. Miyata, S., Tateishi, T. & Ushida, T. Influence of cartilaginous matrix accumulation on viscoelastic response of chondrocyte/agarose constructs under dynamic compressive and shear loading. *J Biomech Eng-T Asme.* **130**, (2008).
 131. Fiore, M. & Degrassi, F. Dimethyl Sulfoxide Restores Contact Inhibition-Induced Growth Arrest and Inhibits Cell Density-Dependent Apoptosis in Hamster Cells. *Exp. Cell Res.* **251**, 102–110 (1999).
 132. Rosenberg, S. A. & McIntosh, J. R. Erythrocyte membranes: Effects of sonication. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **163**, 285–289 (1968).
 133. 伊東正安, 望月剛, “医用音響工学,” 東京電機大学出版社, 2014
 134. Weiss, E., Anastasiadis, P., Pilarczyk, G., Lemor, R. & Zinin, P. Mechanical Properties of Single Cells by High-Frequency Time-Resolved Acoustic Microscopy. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **54**, 2257–2271 (2007).
 135. Lemor, R. M., Weiss, E. C., Pilarczyk, G. & Zinin, P. V. Mechanical properties of single cells - measurement possibilities using time-resolved scanning acoustic microscopy. *IEEE Ultrason. Symp. 2004* **1**, 622–629 (2004).
 136. Fadhel, M. N., Berndt, E. S. L., Strohm, E. M. & Kolios, M. C. High-Frequency Acoustic Impedance Imaging of Cancer Cells. *Ultrasound Med. Biol.* **41**, 2700–2713 (2015).
 137. Shi, J. *et al.* Acoustic tweezers: patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW). *Lab Chip* **9**, 2890–2895 (2009).
 138. Chen, K. *et al.* Rapid formation of size-controllable multicellular spheroids via 3D acoustic tweezers. *Lab Chip* **22**, 133–186 (2016).
 139. Kang, B. *et al.* High-resolution acoustophoretic 3D cell patterning to construct functional collateral cylindroids for ischemia therapy. *Nat. Commun.* **9**, 5402 (2018).
 140. Gu, L. & Livermore, C. Compact passively self-tuning energy harvesting for rotating applications Impact-driven, frequency up-converting coupled vibration energy harvesting device for low frequency operation. *Smart Mater. Struct.* **20**, (2011).
 141. 本多電子株式会社企画・編集・取材, “聞こえない音の世界:超音波ハンドブック,” 本多電子, 2008
 142. Blackstock, D. Fundamentals of physical acoustics. Wiley (2000).
 143. Slie, W. M., Donfor, A. R. & Litovitz, T. A. Ultrasonic Shear and Longitudinal Measurements in Aqueous Glycerol. *J. Chem. Phys.* **44**, 3712–3718 (1966).
 144. Spurný, P., Oberst, J. & Heinlein, D. Photographic observations of Neuschwanstein, a second meteorite from the orbit of the Příbram chondrite. *Nature* **423**, 151–153 (2003).

145. Cheng, N. S. Formula for the Viscosity of a Glycerol–Water Mixture. (2008).
146. Spurný, P., Oberst, J. & Heinlein, D. Photographic observations of Neuschwanstein, a second meteorite from the orbit of the Příbram chondrite. *Nature* **423**, 151–153
147. Takamura, K., Fischer, H. & Morrow, N. R. Physical properties of aqueous glycerol solutions. *J. Pet. Sci. Eng.* 50–60 (2012).
148. Wiklund, M. Acoustofluidics 12: Biocompatibility and cell viability in microfluidic acoustic resonators. *Lab. Chip.* **12**, 2018–2028 (2018).
149. Wang, C.-Z. *et al.* Low-magnitude vertical vibration enhances myotube formation in C2C12 myoblasts. *J. Appl. Physiol.* **109**, 840–848 (2010).
150. Larsson, L.I. Cell Fusions: Regulation and Control. *Springer* (2011).
151. Cho, K. A., Park, M., Kim, Y. H., Woo, S. Y. & Ryu, K. H. Conditioned media from human palatine tonsil mesenchymal stem cells regulates the interaction between myotubes and fibroblasts by IL-1Ra activity. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 130–141 (2017).
152. Suk, Y. *et al.* The alignment and fusion assembly of adipose-derived stem cells on mechanically patterned matrices. *Biomaterials* **33**, 6943–6951 (2012).
153. Lan, R. *et al.* A Novel Wounding Device Suitable for Quantitative Biochemical Analysis of Wound Healing and Regeneration of Cultured Epithelium. *Wound Repair Regen* **18**, 159–167 (2010).
154. Filigheddu, N. *et al.* Ghrelin and Des-Acyl Ghrelin Promote Differentiation and Fusion of C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Mol. Biol. Cell* **18**, 986–994 (2007).
155. Hunt, L. *et al.* Alterations in the expression of leukemia inhibitory factor following exercise: Comparisons between wild-type and mdx muscles. *PLoS Curr.* 1–29 (2011). doi:10.1371/currents.RRN1277
156. Yan, W. *et al.* Tissue Engineering of Skeletal Muscle. *Tissue Eng.* **13**, 2781–2790 (2007).
157. Haraguchi, Y., Kagawa, Y., Hasegawa, A., Kubo, H. & Shimizu, T. Rapid fabrication of detachable three-dimensional tissues by layering of cell sheets with heating centrifuge. *Biotechnol. Prog.* **34**, 692–701 (2018).
158. Kurashina, Y. *et al.* Enzyme-free cell detachment mediated by resonance vibration with temperature modulation. *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 2279–2288 (2017).
159. Kurashina, Y., Takemura, K., Friend, J., Miyata, S. & Komotori, J. Efficient subculture process for adherent cells by selective collection using cultivation substrate vibration. *IEEE Trans Biomed Eng.* **64**, 580–587 (2017).
160. Kurashina, Y., Takemura, K., Miyata, S., Komotori, J. & Koyama, T. Effective cell collection method using collagenase and ultrasonic vibration. *Biomicrofluidics* **8**, 054118 (2014).
161. Yamashita, T., Kollmannsberger, P., Mawatari, K., Kitamori, T. & Vogel, V. Cell sheet mechanics: How geometrical constraints induce the detachment of cell sheets from concave surfaces. *Acta Biomater.* **45**, 85–97 (2016).
162. Nakao, M. *et al.* Formation of large scaffold-free three-dimensional aggregates in a cell culture dish by ultrasound standing wave trapping. *Ultrasound Med. Biol.* in press.

163. Al-Budairi, H., Lucas, M. & Harkness, P. A design approach for longitudinal-torsional ultrasonic transducers. *Sensors Actuators A* **198**, 99–106 (2013).
164. Lepock, J. R., Frey, H. E. & Ritchie, K. P. Protein Denaturation in Intact Hepatocytes and Isolated Cellular Organelles During Heat Shock. *J. Cell Biol.* **122**, 1267–1276 (1993).
165. Leskinen, J. J. & Hynynen, K. Study of Factors Affecting the Magnitude and Nature of Ultrasound Exposure with In Vitro Set-Ups. *Ultrasound Med. Biol.* **38**, 777–794 (2012).
166. 梅田幹雄. はじめての圧電振動子の等価回路と特性測定法. *日本音響学会誌* **72**, 250–256 (2016).
167. Haraguchi, Y. *et al.* Fabrication of functional three-dimensional tissues by stacking cell sheets in vitro. *Nat. Protoc.* **7**, 850–858 (2012).
168. Cerqueira, M. T. *et al.* Cell sheet technology-driven re-epithelialization and neovascularization of skin wounds. *Acta Biomater.* **10**, (2014).
169. Kaneko-Kawano, T. & Suzuki, K. Mechanical stress regulates gene expression via Rho/Rho-kinase signaling pathway. *J Phys Fit. Sport. Med* **4**, 53–61 (2015).
170. Park, J.-H., Ushida, T. & Akimoto, T. Control of cell differentiation by mechanical stress. *J. Phys. Fit. Sport. Med.* **2**, 49–62 (2013).
171. Dorn, C. *et al.* in *Congenital Heart Diseases: The Broken Heart* 251–269 (Springer Vienna, 2016). doi:10.1007/978-3-7091-1883-2_18
172. Tadakuma, K. *et al.* A device for the rapid transfer/transplantation of living cell sheets with the absence of cell damage. *Biomaterials* **34**, 9018–9025 (2013).
173. Rosenberg, S. A. & McIntosh, J. R. Erythrocyte membranes: Effects of sonication. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **163**, 285–289 (1968).
174. Filigheddu, N. *et al.* Ghrelin and Des-Acyl Ghrelin Promote Differentiation and Fusion of C2C12 Skeletal Muscle Cells. *Mol. Biol. Cell* **18**, 986–994 (2007).
175. Chen, S.-J. *et al.* Functional Improvement of Focal Cerebral Ischemia Injury by Subdural Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cells with Fibrin Glue. *Stem Cells Dev.* **19**, 1757–1767 (2010).
176. Memon, I. A. *et al.* Repair of impaired myocardium by means of implantation of engineered autologous myoblast sheets. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **130**, 1333–1341 (2005).
177. Sumaru, K., Edahiro, J., Ooshima, Y., Kanamori, T. & Shinbo, T. Manipulation of living cells by using PC-controlled micro-pattern projection system. *Biosens. Bioelectron.* **22**, 2356–2359 (2007).

本研究に関する業績

学術論文

1. Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Cell patterning method using resonance vibration of metallic cell cultivation substrate, *Advanced Biomedical Engineering*, Vol. 5, pp. 142-148, 2016.
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*, Vol. 66, pp. 111-118, 2019.

国際会議録

1. *Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Shogo Miyata, Jun Komotori, Cell Manipulation by Nodal Circle Resonance Vibration of a Cell Cultivation Substrate, *IEEE Int. Ultrasonic Symposium*, 21-24 Oct, 2015, Taipei, Taiwan.

国際会議

1. *Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Shogo Miyata, Jun Komotori, Cell Manipulation by Nodal Circle Resonance Vibration of a Cell Cultivation Substrate, *IEEE Int. Ultrasonic Symposium*, 21-24 Oct, 2015, Taipei, Taiwan. (ポスター発表)
2. Chikahiro Imashiro, *Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, “Manipulation of Myoblasts in Cell Cultivation Dish Using Resonance Vibration of Disk with a Single Nodal Circle” *IEEE Int. Ultrasonic Symposium*, 18-21 Sep, 2016, Tours, France. (ポスター発表)
3. *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, 2016 *IEEE Micro- and Nanoengineering in Medicine Conference*, 12-16, Dec, 2016, Waikoloa, Hawaii. (ポスター発表)
4. *Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, “Proliferation of C2C12 patterned by resonance vibration of a transducer”, *International Workshop on Quantitative Biology 2017*, 14-15, April, 2017, Kanagawa, Japan. (口頭発表およびポスター発表)
5. *Chikahiro Imashiro, Makoto Hirano, Yuki Fukuma, Kiyoshi Ohnuma, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Cell Sheet Fabrication by Langevin Piezoelectric Transducer having Homogeneous Thickness Vibration Mode, 2018 *IEEE Micro- and Nanoengineering in Medicine Conference*, 10-14, Dec, 2018, Kauai, Hawaii. (ポスター発表)
6. *Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura. Cell Patterning Technique on a Widely Used Culture Dish by Ultrasonic Vibration Propagated from a Disk-shaped Vibration Transducer, *Keio University International Symposium on Advanced Technologies for Mechano-biology and Regenerative Medicine*, 21, Sep, 2018, Kanagawa, Japan. (ポスター発表)

国内会議

1. *今城哉裕, 倉科佑太, 竹村研治郎, 培養面の固有振動を用いた細胞マニピュレーション手法, 日本再生医療学会, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪国際会議場, 大阪, 2016年3月17-19日. (ポスター発表)
2. *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, 北海道2016年9月17-18日. (ポスター発表)
3. *今城哉裕, 倉科佑太, 竹村研治郎, 培養面の固有振動を用いた細胞マニピュレーション手法, 日本再生医療学会, 第15回日本再生医療学会総会, 大阪府, 2016年3月17日. (ポスター発表)
4. *今城哉裕, 倉科佑太, 中尾美紗, 竹村研治郎, 固有振動を用いたディスポーザブルディッシュ内における細胞パターンニング, 細胞アッセイ技術の現状と将来, 東京都, 2017年1月31日. (ポスター発表)
5. *今城哉裕, 平野真, 福岡優希, 大沼清, 倉科佑太, 竹村研治郎, 超音波振動による培養ディッシュからの細胞シート剥離, 第18回日本再生医療学会総会, 兵庫県, 2019年3月21-23日. (口頭発表)
6. *今城哉裕, 田内葉奈子, 栗原大輝, 倉科佑太, 戸谷希一郎, 竹村研治郎, 低濃度のトリプシンと超音波照射による汎用フラスコからの細胞剥離, 第58回日本生体医工学会大会, 沖縄県, 2019年6月. (ポスター発表予定)

招待講演

1. Chikahiro Imashiro, Cell culture method using ultrasonic vibration for tissue engineering and regenerative medicine, 2019, 18, Jan. 【理化学研究所新宅マイクロ流体工学理研白眉研究チームにて招待講演】
2. Chikahiro Imashiro, Cell sheet detachment from ubiquitous culture vessels by ultrasonic vibration, 2019, 27, Feb. 【東京大学合田研究室における招待講演】

公開中特許

1. 今城哉裕, 倉科佑太, 竹村研治郎, 寺尾優佑, 細胞パターンニング装置及び細胞パターンニング方法, 特開2018-042534, 2018年03月22日公開.
2. 今城哉裕, 倉科佑太, 竹村研治郎, 細胞生産方法及び細胞生産装置 (CELL PRODUCTION METHOD AND CELL PRODUCTION DEVICE), PCT WO/2019/044804, 2019年7月13日国際公開

受賞

1. 生体医工学シンポジウムベストリサーチアワード, Chikahiro Imashiro, Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, “Cell patterning method using resonance vibration of metallic cell cultivation substrate”, 2016年9月17日.
2. Best Poster Award, Chikahiro Imashiro, Cell Patterning Technique on a Widely Used Culture Dish by Ultrasonic Vibration Propagated from a Disk-shaped Vibration Transducer, Keio University

International Symposium on Advanced Technologies for Mechano-biology and Regenerative Medicine, 21, Sep, 2018, Kanagawa, Japan.

その他の学術論文

1. 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*, Vol. 114, No. 10, pp. 2279-2288, 2017.
2. Misa Nakao, Yuta Kurashina, Chikahiro Imashiro, and Kenjiro Takemura, A method for collecting single cell suspensions using an ultrasonic pump, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Vol. 65, No. 1, pp. 224-231, 2018
3. Misa Nakao, Chikahiro Imashiro, Taiki Kuribara, Yuta Kurashina, Kiichiro Totani, and 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*, Vol. 45, No. 5, pp. 1306-1315, May, 2019.
4. Hanako Tauchi, Chikahiro Imashiro, Taiki Kuribara, Genichiro Fujii, Yuta Kurashina, Kiichiro Totani, Kenjiro Takemura, Effective and intact cell detachment from a clinically ubiquitous culture flask by combining ultrasonic wave exposure and diluted trypsin, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* (inpress)[Chikahiro Imashiro と Hanako Tauchi は Co-first author である.]