

学位論文 博士（工学）

金属製培養基材の固有振動による
接着性細胞の剥離

2016 年度

慶應義塾大学大学院理工学研究科

倉科 佑太

- 目次 -

1 緒論	1
1.1 再生医療の動向	1
1.2 細胞培養に必須の3大要素	4
1.2.1 細胞	4
1.2.2 足場 (Scaffold)	8
1.2.3 増殖因子	11
1.3 接着性細胞の培養プロセス	12
1.4 細胞の剥離と回収	13
1.4.1 酵素処理を用いた方法	14
1.4.2 物理的な方法	15
1.4.3 化学的な方法	15
1.5 細胞培養の効率化	17
1.5.1 自動細胞培養システム	18
1.5.2 その他の細胞培養システム	21
1.6 細胞培養における超音波振動の応用技術	22
1.6.1 遺伝子導入への応用	23
1.6.2 細胞活性の向上への応用	23
1.6.3 細胞マニピュレーションへの応用	24
1.7 本研究の目的	26
2 金属製細胞培養器	27
2.1 培養基材の材料の選定	27
2.2 培養基材の表面改質	28
2.2.1 微粒子ピーニング (FPP) 処理を施した基材の製作	29
2.2.2 基材上の凹凸の観察	30
2.3 細胞培養特性の評価実験の方法	33
2.3.1 培養面 (基材) の準備	33
2.3.2 細胞の準備	34
2.3.3 細胞の増殖性実験	34
2.3.4 顕微鏡による観察	35
2.3.5 細胞の移動性実験	36
2.3.6 アポトーシスの判別実験	37
2.4 細胞培養特性の評価結果および考察	38
2.4.1 細胞の増殖性と接着挙動に及ぼす凹凸の影響	38

2.4.2	細胞移動に及ぼす凹凸の影響	40
2.4.3	細胞培養に優れた微粒子ピーニング処理表面の選定	42
2.5	金属製細胞培養器の製作および細胞毒性評価	43
2.5.1	金属製細胞培養器の製作	43
2.5.2	金属製細胞培養器の細胞毒性評価の方法	46
2.5.3	金属製細胞培養器の細胞毒性評価の結果	46
2.6	小括	47
3	トリプシンと固有振動による細胞の剥離	49
3.1	コンセプト	49
3.2	固有振動を励振可能な培養器の設計と製作	49
3.2.1	培養基材の固有値解析	49
3.2.2	培養器の製作	55
3.2.3	培養基材の振動特性	56
3.3	トリプシンと固有振動による細胞剥離実験の方法	61
3.3.1	培養器の準備	61
3.3.2	細胞の準備	61
3.3.3	細胞の剥離方法	62
3.3.4	回収および残存した細胞数の測定方法	62
3.3.5	固有振動を励振した後に培養面に残存した細胞の分布	63
3.3.6	回収および残存した細胞の増殖性実験の方法	64
3.4	トリプシンと固有振動による細胞剥離実験の結果および考察	66
3.4.1	回収および残存した細胞数の比較	66
3.4.2	固有振動を励振した後に培養面に残存した細胞の分布	69
3.4.3	回収および残存した細胞の増殖性	69
3.5	小括	75
4	コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離	76
4.1	コンセプト	76
4.2	金属製培養器の改良	76
4.2.1	圧電素子の見直し	76
4.2.2	改良した金属製培養器	79
4.2.3	培養基材の振動特性	79
4.2.4	培養基材の温度変化	83
4.3	コラゲナーゼと固有振動による細胞剥離実験の方法	83
4.3.1	培養器の準備	84
4.3.2	細胞の準備	84

4.3.3	細胞の剥離方法	84
4.3.4	回収した細胞数の測定方法	86
4.3.5	回収した細胞の増殖性実験の方法	86
4.3.6	顕微鏡による観察方法	86
4.4	コラゲナーゼと固有振動による細胞剥離実験の結果および考察	88
4.4.1	コラゲナーゼと固有振動による剥離方法の有効性	88
4.4.2	回収した細胞の様相	90
4.5	コラゲナーゼと固有振動が細胞剥離に及ぼす影響	93
4.5.1	固有振動が細胞剥離に及ぼす影響	93
4.5.2	コラゲナーゼが細胞剥離に及ぼす影響	95
4.6	小括	97
5	温度刺激と固有振動による細胞の剥離	98
5.1	コンセプト	98
5.2	温度刺激付与システム	99
5.2.1	温度刺激付与システムの製作	99
5.2.2	培養基材の温度制御の方法	101
5.2.3	温度刺激付与システムの冷却特性	103
5.3	温度刺激と固有振動による細胞剥離実験の方法	103
5.3.1	培養器の準備	105
5.3.2	励振する固有振動の条件	105
5.3.3	細胞の準備	105
5.3.4	細胞の剥離方法	107
5.3.5	回収した細胞数の測定方法	107
5.3.6	回収した細胞の増殖性実験の方法	108
5.3.7	回収した細胞を凍結および解凍した後の増殖性実験の方法	108
5.3.8	顕微鏡による観察方法	108
5.3.9	細胞の表面タンパク質の測定	109
5.4	温度刺激と固有振動による細胞剥離実験の結果および考察	110
5.4.1	異なる温度刺激を付与した際に剥離した細胞数	110
5.4.2	異なる振幅の固有振動を励振した際に剥離した細胞数	111
5.4.3	回収した細胞の増殖性	113
5.4.4	回収した細胞を凍結および解凍した後の増殖性	114
5.4.5	回収した細胞の様相	115
5.4.6	回収した細胞の表面タンパク質	115
5.5	小括	119

6 結 論	120
謝 辞	122
本研究に関する業績	123
参考文献	127

1 緒論

1.1 再生医療の動向

近年、iPS 細胞が樹立され、2014 年には世界初の臨床適応が行われたように、国内外を問わず再生医療に関わる研究が盛んに行われている。再生医療の目的は機能不全に陥った細胞組織や臓器の再生であり、従来の治療法と比較して、極めて良好な治癒成果が数多く報告されている[1-3]。再生医療は、1993 年に Langer と Vacanti [4]によって提唱された概念であり、細胞の培養によって本来の機能を可能な限り保持した組織や臓器を作る治療である。生体機能を保持した組織や臓器を再生するには、細胞だけでなく、細胞を保持するために形成される足場 (scaffold) および細胞の増殖や分化などの細胞成長に影響を及ぼす増殖因子の 3 要素を組み合わせることが必要とされている。

再生医療による治療の初期の一例として、1981 年に O'Conner らにより報告された培養表皮による熱症患者の治療が挙げられる[5]。この治療では、患者の皮膚から単離した皮膚細胞を数週間培養し、生成した表皮細胞シートを患部に適用して熱症患者の皮膚を治癒した。この治療は従来用いられていたドナーからの皮膚移植に代わる拒絶反応の起こらない新たな治療法であり、高い治癒能力が注目された。また、Gallico ら[6]は 95 %以上もの皮膚を熱症で損傷した 2 人の幼児に、培養表皮を用いて治療を行い、半分以上の患部を再生できたと報告している。このように、培養表皮は現在最も広く用いられている再生医療のひとつであり、1988 年にはアメリカで Epicel が製品化された[7]。また、日本では 2007 年にジャパンティッシュエンジニアリングから Jace が製品化されている[8]。培養表皮以外にも 1994 年に Brittberg ら[9]により自家培養軟骨治療 (Fig. 1-1) が考案された。自家培養軟骨治療では、患者の正常な軟骨部位から軟骨組織を採取し、軟骨細胞を単離した後に、数週間培養する。培養することで増殖した軟骨細胞を患部に注入し、細胞が患部から流れ出ないように骨膜により患部を被覆し、軟骨の再生を図る。

皮膚や軟骨以外に期待されている分野に眼球と心臓がある。これら二つの分野はともに iPS 細胞を用いた治療方法が注目されている。iPS 細胞とは、人工多能性幹 (Induced Pluripotent Stem) 細胞の略称であり、京都大学の山中伸弥教授のグループが世界で初めて樹立に成功した[10]。iPS 細胞とは、複数の遺伝子 (たとえば、Oct3/4, Sox2, c-Myc および Klf4) を導入して初期化された細胞であり、受精卵のように分化万能性を発現する細胞である。2007 年には、ウィスコンシン大学マディソン校の James Thomson 教授[11]と京都大学の山中伸弥教授[12]がヒトの細胞を用いた iPS 細胞の樹立を発表している。iPS 細胞の性質は胚性幹 (ES)

細胞と類似している。しかし、ヒトの胚を壊して採取する必要がある ES 細胞のように、倫理的な問題が生じないことから、iPS 細胞が樹立して以来、万能細胞の研究は急速な成長を遂げている。

たとえば、眼球の分野では iPS 細胞由来の網膜色素上皮細胞による加齢黄斑変性の治療[13]が挙げられる。網膜は体表面に存在し、色素を有する細胞組織であるため、治療後のガン化などの異常を早期に発見しやすく、異常が発生した後もレーザー治療などで比較的簡単に対処が可能である。このため、iPS 細胞による治療で想定されるリスクを管理でき、臨床応用での利用が期待されている。2014 年に世界に先駆けて、理化学研究所により iPS 細胞を用いた加齢黄斑変性の治療が実施され、現在は術後経過の観察が行われている段階である。さらに、網膜と同様に体表面に存在する角膜上皮細胞も iPS 細胞を用いた再生医療の臨床応用に向けて研究が行われている。これまで角膜の治療には、自家の口腔粘膜組織から細胞シートを生成して移植する方法が主流であった。しかし、移植した口腔粘膜が完全には角膜上皮化せず、術後の視力が 0.1 以下にとどまることも多く、長期的な回復を見込むことは難しい[14]。この手法に代わる新たな手法として iPS 細胞由来の角膜上皮細胞を用いた治療[15]が注目され、網膜同様に iPS 細胞由来の角膜上皮細胞の治療法は臨床応用間近である。

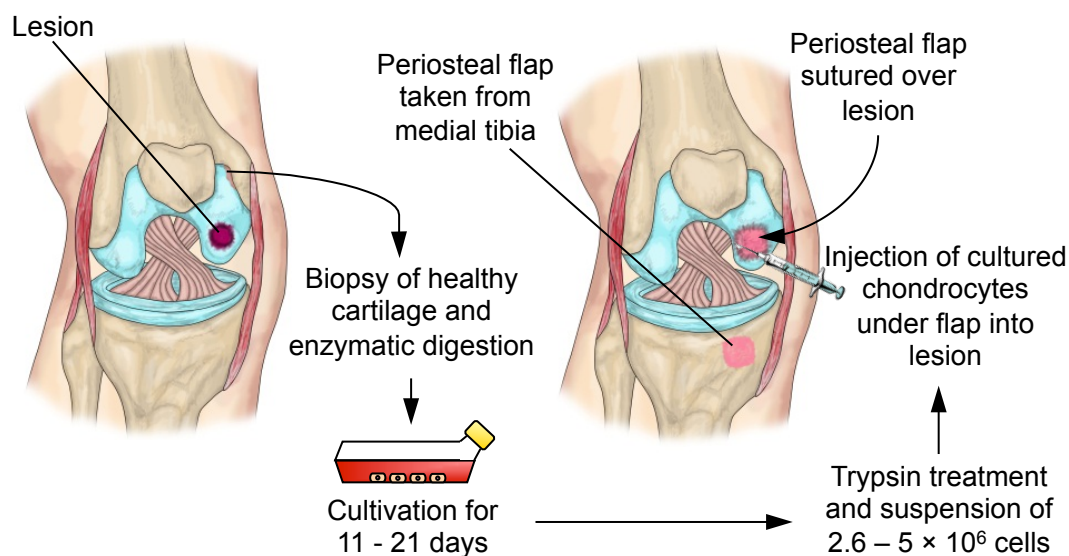


Fig. 1-1 Imaged of chondrocyte transplantation in the right femoral condyle.

さらに、iPS 細胞は心臓に対する再生医療においても注目が集まっている。特に、iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた再生心筋細胞移植は、深刻なドナー不足の問題を抱える重症心不全の治療において、唯一の根幹治療として期待されている。しかし、心臓に iPS 細胞由来の細胞を用いるためには多くの問題を抱えている[16]。具体的には、大量の心筋細胞の培養が必要であることと、未分化細胞を完全に除去する必要があることである。ヒトの心臓は 1.0×10^9 個以上の膨大な心筋細胞から構成されており、治療にも同様に膨大な細胞を必要とする。このため、iPS 細胞から治療に必要な大量の細胞数を獲得するためには、莫大な労力と時間が必要となる。この問題を解決するために、最近ではスピナーフラスコを用いた 3 次元旋回培養[17]が行われている。この方法では、細胞を球状の塊に凝集することで、単位占有体積あたりに多くの細胞を培養できる利点がある。しかし、細胞を凝集させると細胞ごとに周囲の環境が異なるため、活性や分化の程度にばらつきが生じてしまうことや、凝集塊が大きくなると細胞同士が接触障害を起こし増殖性が著しく低下してしまうという欠点がある。これらの問題を解決するためにナイロンフィルタを使って細胞塊の大きさを小さく維持[18]して、個体差が生じないようにするなどの工夫が行われている。また、iPS 細胞の細胞塊が末端細胞に分化誘導すると、いくつかの未分化細胞が残存してしまい 100% 分化することができない。この残存した未分化細胞はがん化する危険性を有しているため、未分化細胞を残存させた状態で心臓疾患の治療に適用することはできない。このため、分化後に未分化細胞を除去する純化精製を行う必要がある。Tohyama [19]らは、未分化細胞と心筋細胞の生存に必要な栄養素の違いを利用した無グルコース無グルタミン乳酸添加培地を用いて 98.7% を心筋細胞とする純化精製法を考案した。これらの研究により、iPS 細胞由来の心筋細胞を用いた治療法は徐々に臨床応用に近づいており、治療法の確立に大きな期待が寄せられている。

以上に述べたように、再生医療に対する期待は極めて高く、Fig. 1-2 に示すように 2030 年には 2012 年の約 100 倍にあたる 1 兆円を越える市場規模になると予想[20]されている。このように、再生医療は今後の医療で最も期待されている新たな治療法の一つである。しかし、これまで説明したように、いかなる治療法でも細胞を体外で培養し、治療に必要な数になるまで細胞を増殖させるプロセスが必要である。現状では、こうした細胞培養の大部分は手作業により行われている[21]が、手作業による細胞培養では、技術者の手技の差や人為的ミスなどが発生することがあり、安定した細胞の供給が困難で極めて非効率である。このため、再生医療の普及には、従来の培養方法に代わる培養方法の確立が急務とされている。

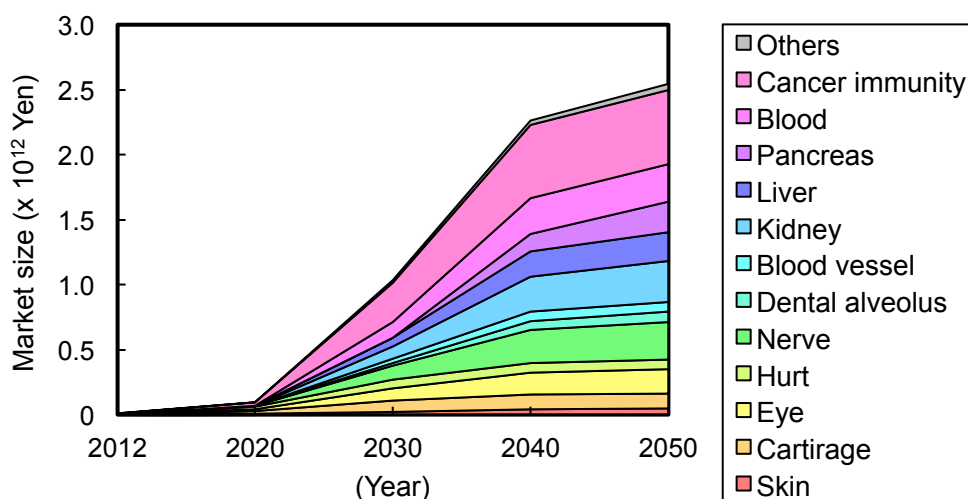


Fig. 1-2 Market size of tissue engineering and regenerative medicine in the future (Japan)

1.2 細胞培養に必須の3大要素

Langer と Vacanti により提唱された再生医療のための細胞培養には、細胞の他に、細胞を保持するために製作される足場 (scaffold) および細胞の増殖や分化などの細胞成長に影響を及ぼす増殖因子の3要素を組み合わせることが必要である。以下は、これらの要素について説明する。

1.2.1 細胞

細胞は浮遊性細胞と接着性細胞に大別できる。浮遊性細胞は通常、基材に接着せずに液中に漂い、生存している。血液内の赤血球、白血球、血小板は浮遊性細胞である。これらの浮遊性細胞は通常、パドル翼により細胞懸濁液を攪拌して培養するスピナーフラスコ (Fig. 1-3a) を用いて培養する。一方、接着性細胞は、足場に接着することで成長、増殖するため、

単層の培養フラスコ (Fig. 1-3b) や培養ディッシュ上で培養する。

接着性細胞には接着するための足場 (scaffold) が必要である。Fig. 1-4 に接着性細胞が足場に接着するメカニズムを示す。細胞を懸濁した培地を足場に散布すると (Fig. 1-4a), 培地内の細胞外マトリックス (ECM) と呼ばれるタンパク質が足場に吸着する (Fig. 1-4b)。その後, 細胞は ECM を介して足場に接触する (Fig. 1-4c)。ECM を感知した細胞は ECM に向かって仮足を伸展させて接着する (Fig. 1-4d)。仮足を伸ばして接着した後, 細胞は成長し, 増殖を開始する[22]。Kanchanwong ら[23]は, ECM の構成タンパク質を超解像蛍光顕微鏡により観察した。Fig. 1-5 に示すように, 細胞はインテグリンに代表される多くのタンパク質を介して ECM に接着している。これらのタンパク質は細胞膜裏打ちタンパク質[24]と呼ばれ, 裏打ちタンパク質を介することで細胞は細胞外部からのシグナルを受容して, 細胞の移動や形態の変化, 情報伝達などを行うことが可能である。

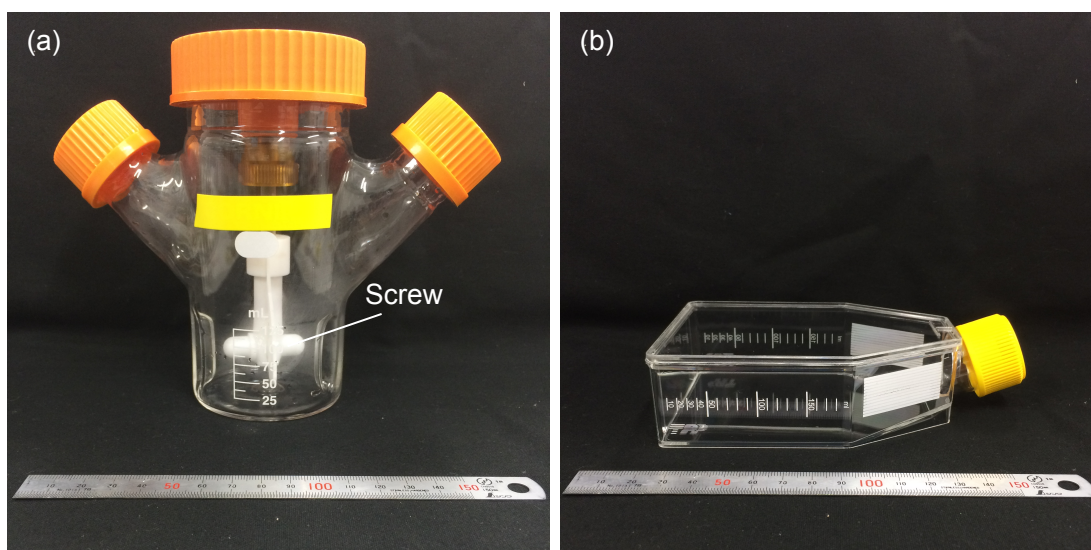


Fig. 1-3 Image of (a) spinner and (b) monolayer flask.

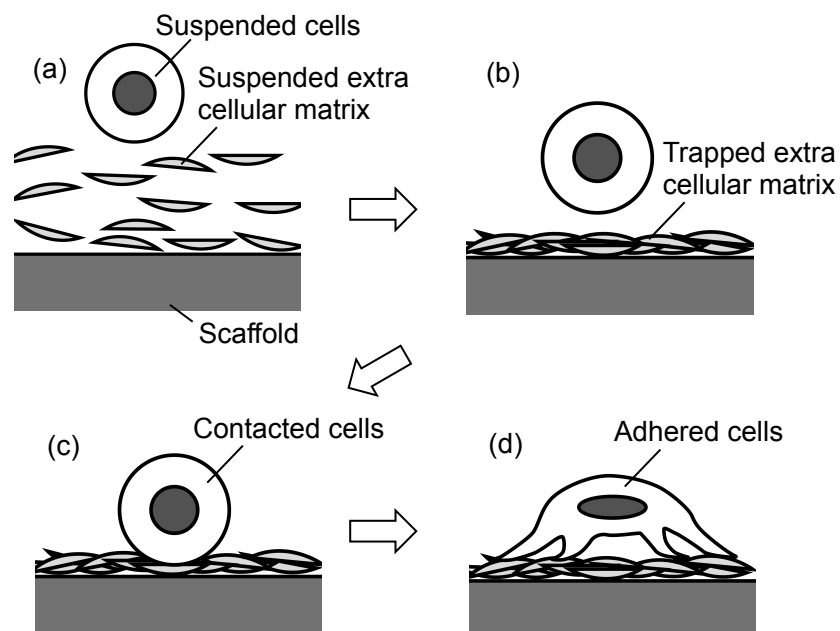


Fig. 1-4 Schematic illustration of cell adhesion sequence. (a) Medium within cells are spread on a scaffold. (b) ECM is trapped to scaffold. (c) Cell contacts on a scaffold through ECM. (d) Cell extends its filopodium to adhere to the scaffold.

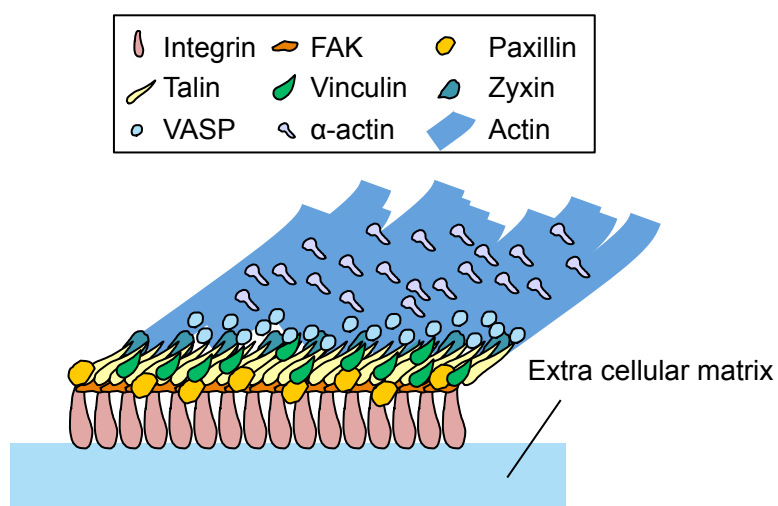


Fig. 1-5 Intracellular anchor proteins composed of focal adhesion.

体内では、接着性細胞は細胞同士や ECM と互いに情報を交換しながら、立体的に接着している。一方、体外でディッシュやフラスコなどにより培養されたときは、体内での細胞とは異なる挙動を示す。この現象は脱分化と呼ばれており、例えば軟骨細胞では脱分化により ECM 分泌能力が低下する代わりに、増殖性が向上することが報告されている[25]。近年では、接着性細胞をディッシュやフラスコなどで単層培養する以外に、ポーラス材やコラーゲングルなどの 3 次元足場を用いた 3 次元培養も行われている。3 次元足場で培養された接着性細胞は足場に立体的に接着するため、その挙動は、単層培養した場合と比較して体内での細胞に近づくことが知られている。Fig. 1-6 に単層および 3 次元培養を行ったときの細胞の接着の様子を模式的に示す。一般的に単層培養すると細胞は脱分化して、その増殖性が向上する。一方で、3 次元培養すると細胞は分化状態を維持、促進し、ECM 分泌能力の向上や骨化形成の促進など、その細胞固有の機能が向上する。

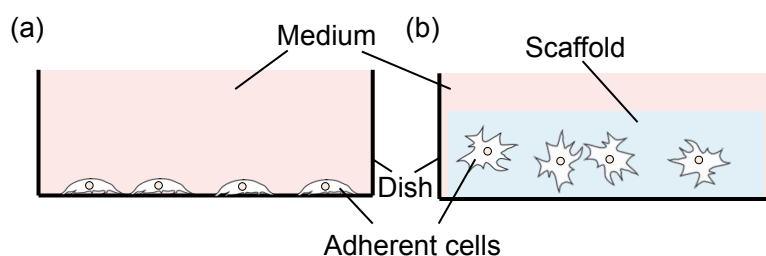


Fig. 1-6 Comparison of cells adhered to (a) two dimension and (b) three dimension scaffold.

1.2.2 足場 (Scaffold)

1.2.1 項で述べたように接着性細胞を培養するためには、足場 (Scaffold) が必要である。とくに、単層培養するためには細胞が接着できる培養基材を準備する必要がある。1907 年に、Harrison[26]らは神経組織をスライドガラス上で培養し、神経細胞の樹状突起の伸展を観察した。これは世界で初めて人工の培養基材を用いて細胞の培養に成功した研究である[27]。このようにガラス材料は古くから用いられてきた培養基材であり、細胞培養する際に重要な滅菌や経時観察を可能とする。ガラス材料は融点温度が高く、一般的に普及している滅菌方法であるオートクレーブ滅菌 (121 °C, 2 気圧, 20 分) や乾熱滅菌 (180 °C, 60 分) を行うことができる。また、多くの細胞は無色透明なため、通常の実体顕微鏡では観察することができない。このため、細胞の経時観察には位相差顕微鏡を用いる。位相差顕微鏡とは、異なる屈折率をもつ物質を透過した光を比較すると位相差が生じる現象を利用して観察する顕微鏡である。ガラス材料は光透過性が高いため、位相差顕微鏡により細胞を経時観察可能である。しかし、ガラス材料は加工が難しく、プレートやディッシュなど形状が単純な規格以外に製作することは比較的困難である。

細胞はガラス基材以外にも様々な基材上で培養されている。現在細胞培養に最も広く用いられているのは高分子材料である。特に、ポリスチレンは多くの培養基材に用いられており、接着性細胞の初期接着を促すために培養面をプラズマ処理により疎水性に加工[28]したポリスチレン製の培養基材が多く市販されている。ポリスチレンに代表される多くの高分子製の培養基材は光透過性があり、位相差顕微鏡による観察が容易である。また、高分子材料は複雑な形でも成形が容易で安価であるため、ガラス基材に代わり広く用いられるようになった[21]。しかし、高分子基材は一般的にガラスと比較して耐熱性が低く、オートクレーブ滅菌や乾熱滅菌することができない場合も多い。このため、多くの高分子材料はエチレンオキサイドガスや電子線により滅菌されている。しかし、エチレンオキサイドガスは可燃性の有毒ガスである。また、電子線の利用には巨大な電子加速装置が必要である。このため、これらの滅菌方法は特殊な施設でしか使用できず、高分子製の培養基材は製造工場出荷前に滅菌処理が施され、ディスポーザブル製品として用いられることが多い。

ガラスや高分子材料以外にバイオマテリアルとして一般的に用いられている材料として金属がある。金属はインプラント材料として長い歴史を持ち、紀元前から歯科治療に用いられているなどバイオマテリアルとして独自の進化を遂げている。ステンレス鋼の一種である SUS 316L やチタン (純チタンおよびチタン合金) は生体適合性の高い金属材料として知られている。SUS 316L は加工が容易であり、表面に形成される不動態被膜による高耐食

性のために古くから外科インプラント用の材料として用いられてきた。しかし、チタンと比較すると耐食性は低く、現在では治癒後に除去することを前提とした一時的なインプラント材料として用いられている[29]。チタンは SUS 316L と同様に生体適合性の高い材料であるが、SUS 316L 以上の耐食性を持ち、さらにオッセオインテグレーションが起こることから、現在では大部分のインプラントにチタンが用いられている。オッセオインテグレーションとはチタンと骨組織が拒絶反応なく一体化する現象であり、Brånemark により発見[30]された。Fig. 1-7 にオッセオインテグレーションのメカニズムを示す。チタンを体内に埋入すると、体液がチタンと骨の間を満たす (Fig. 1-7a)。その後、骨芽細胞により分泌される I 型コラーゲンやオステオカルシンなどによりリン酸カルシウムの結晶がチタンの表面に形成される (Fig. 1-7b)。最終的に、新生骨がチタンと骨の間に形成される (Fig. 1-7c)。金属材料の中でオッセオインテグレーションが起こるのはチタンのみであり、チタンは骨と接着させることを目的とするインプラント材料として重宝されている。その反面、熱伝導率の低さやヤング率の低さから、加工精度や表面粗さが保てず、切り粉が発火するなど極めて加工が難しく、加工コストも増大することから大量生産には向かない。

このような性質を有したチタンに表面処理を施すことで骨との接着を早める研究が数多く報告されている。板橋ら[31]はワイヤ放電加工により表面加工したチタン基材と未処理材を比較して骨芽細胞の初期接着性が向上することを報告している。また、Jayaraman ら[32]はサンドブラスト処理やエッチング処理、溝加工を施したチタン基材で培養した骨芽細胞様細胞の増殖性が向上することを報告している。サンドブラストとエッチングを組み合わせた処理方法を Sand-blasted Large-grit Acid-etched (SLA) 処理と呼び、SLA 処理を施したチタン基材で培養した細胞の接着性や増殖性が向上する事例は複数報告されている[33, 34]。また、チタン基材に微細的凹凸を付与することで細胞の接着性や増殖性を向上させる試みも行われている。長井ら[35]は微粒子ピーニング (FPP) 処理[36-38]により Ti-6Al-4V 合金に微視的凹凸を付与し、その上で培養した L929 細胞の接着性と増殖性が鏡面上で培養した細胞と比較して向上したことを報告している。

以上のように、金属基材はバイオマテリアルとして広く用いられているが、大部分の使用用途はインプラント材料であり、これまで細胞の培養基材としては一般的には用いられていない。

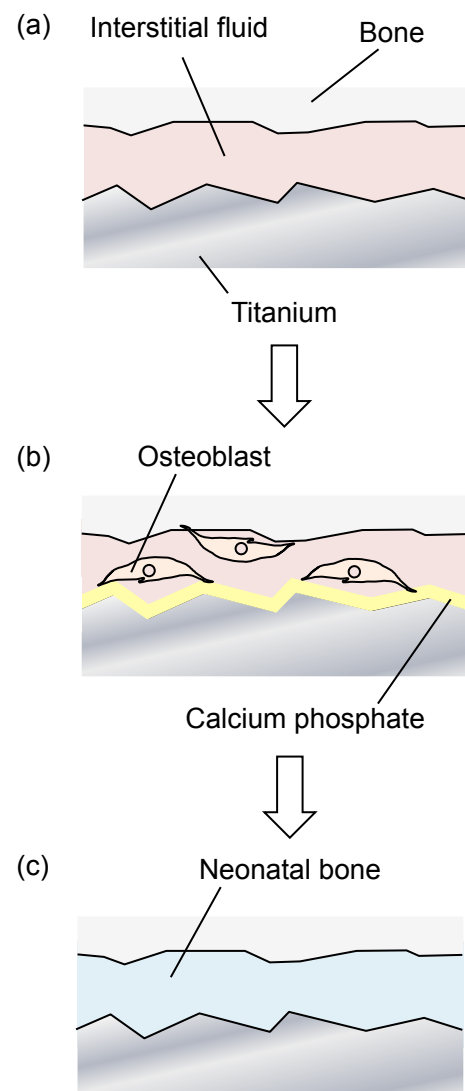


Fig. 1-7 Mechanism of osseointegration generated between osteoblast and titanium. (a) Interspace between bone and titanium become filled with interstitial fluid. (b) Calcium phosphate nanocrystals deposit on surface of titanium and osteoblast gets active. (c) A neonatal bone is formed between bone and titanium.

1.2.3 増殖因子

前述のように、接着性細胞を培養するためには、細胞が接着するための足場を準備する必要がある。しかし、足場に接着した細胞が成長や増殖、分化するためには、サイトカインや成長因子などのタンパク質を必要とする。これらのタンパク質は細胞の増殖因子のひとつであり、これらは細胞を培養するために必須である。このため、栄養分を含んだ培地と呼ばれる培養液に一般的に添加されている。具体的には、通常の培地ではウシなどほ乳類から採取された血清（FBS）を10%程度添加する。

培地中に含まれる成分の中で Mg^{2+} と Ca^{2+} は特に細胞接着と密接な関係にある。Ohnumaら[39]は培地中の Mg^{2+} と Ca^{2+} の量を調節することで、細胞の接着を抑制した。Fig. 1-8 に示すように、 Mg^{2+} の添加量が少ない場合には細胞とECMの接着が弱まり、細胞が基材から容易に剥離し、 Ca^{2+} の添加量が少ない場合には細胞間接着が弱まり、細胞同士が接着せずにシングルセルの状態では細胞が基材に接着すると報告している。

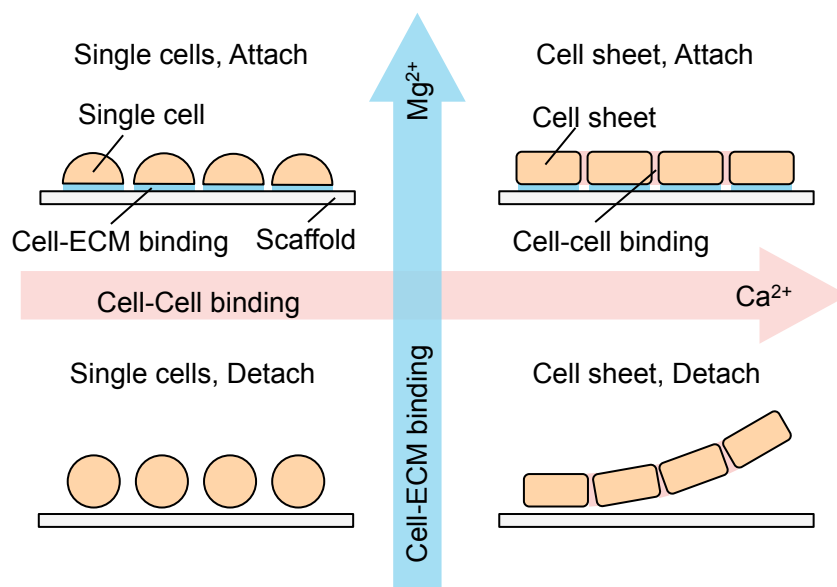


Fig. 1-8 Schematic illustration of cell adhesion behavior of with or without Mg^{2+} and Ca^{2+} .

体内の細胞はヒトが活動するにあたり、様々な刺激を受けている。例えば、膝を曲げることで軟骨細胞は圧縮刺激を受け、腕を伸ばすことで筋肉細胞は引張刺激を受け、血液が流れることで血管内皮細胞はせん断刺激を受ける。これらの刺激は、総称して機械的刺激と呼ばれる。機械的刺激は化学的な刺激ではないものの、広義に増殖因子の一種といえる。この機械的刺激を細胞が受けることで、細胞の増殖性や ECM の産生能力が向上し、分化が促進される。赤土ら[40]はコラーゲンゲルに埋入した筋芽細胞に周期的な伸展刺激を付与することで、刺激を付与していない筋芽細胞と比較して、電気刺激による収縮力が増加することを報告している。

以上のように、増殖因子には化学的な刺激から機械的な刺激まで様々な刺激が存在する。

1.3 接着性細胞の培養プロセス

これまでに、細胞や細胞を培養するために必須となる足場や成長因子を説明した。次に、接着性細胞の培養プロセスについて説明する。Fig. 1-9 に細胞培養プロセスを模式的に示す。細胞培養用のフラスコやディッシュに適切な量の細胞を播種 (Fig. 1-9a) し、インキュベータ内で培養 (Fig. 1-9b) する。CO₂ 濃度 5% で温度 37 °C の湿潤環境において、培養基材に接着した細胞は増殖因子を添加した培地中で、底面に接着して底面全体に広がるように増殖する。このとき、細胞の栄養供給や老廃物を排除するために、必要に応じて培地の交換を行う。培養基材に接着した細胞の密度が一定以上になると、細胞の増殖性は極端に落ち、最終的には死滅する。この現象は接触障害 (Contact inhibition) [40] と呼ばれる。このため、培養基材全面に増殖した数以上の細胞数を必要とする場合には、一度細胞を剥離 (Fig. 1-9c) して回収 (Fig. 1-9d) し、低密度で再度播種、培養する必要がある。この作業は一般的に継代と呼ばれており、この作業を繰り返すことで、所望の細胞数を獲得する。

先述したように、細胞培養は大部分が手作業により行われている。播種の段階では無菌状態のフラスコやディッシュに一定数の細胞と培地を播く作業のみであり、培養の段階では必要に応じてフラスコやディッシュの底面に接着している細胞の数や状態を位相差顕微鏡により観察するだけでよい。しかし、細胞の剥離と回収の段階では、煩雑な作業を必要とする。たとえば、一般的な細胞培養で用いられているタンパク質分解酵素による細胞の剥離と回収では、タンパク質分解酵素を散布する前に細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄する。これは、培地に含まれる血清がタンパク質分解酵素を阻害するためである。洗浄後、タンパク質分解酵素を散布して、数分間インキュベータ内に静置する。細胞を位相差顕微鏡により観察して、必要に応じて振とうやピペッティングを行うことで細胞を培

養面から剥離する。剥離した細胞を回収後、培地を加えて細胞を洗浄する。その後、細胞のみを取り出すために遠心分離にかけて、上澄み液を捨てる。再度、培地を添加して細胞ごと回収することで、細胞の剥離および回収の作業が完了する。このように、細胞の剥離と回収の作業は播種と培養の作業と比較して、多くの作業を必要とする。このため、コンタミネーションが発生する危険は剥離、回収の作業中に生じることが多い。以上のことから、培養効率を向上させるためには、剥離および回収の方法を改善する必要がある。

1.4 細胞の剥離と回収

本節では、一般的な継代作業で細胞の剥離と回収に用いられるタンパク質分解酵素の一種であるトリプシンをはじめ、他の酵素や酵素を用いないで細胞を剥離、回収する方法を説明する。

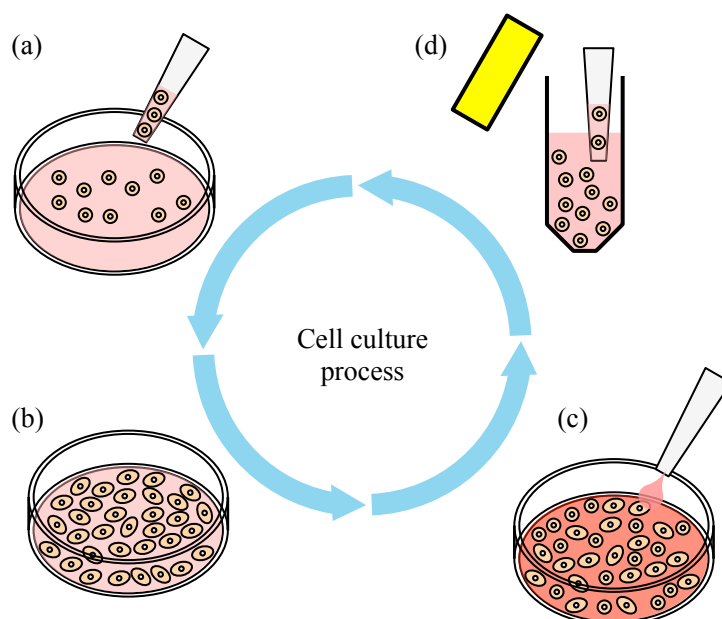


Fig. 1-9 Cell culture process in case of adhered cells. (a) Cells are spread on a cell culture dish/flask. (b) Cells adhere to a substrate of the cell culture dish/flask. After that, (c) enzyme are spread to adhered cells and these cells are pipetted. (d) Cells are collected and rinsed in a centrifuge tube.

1.4.1 酵素処理を用いた方法

一般的な細胞の回収には、細胞の仮足を分解するためにトリプシンをはじめとしてタンパク質分解酵素が用いられている。以下に一般的に細胞培養に用いられる酵素を述べる。

(i) トリプシン

先述したように、トリプシン処理は一般的な細胞培養で接着性細胞の剥離、回収に広く使用されている方法である。細胞を剥離するためにはトリプシン濃度が 0.025~0.050% の Trypsin-EDTA に細胞を数分間浸漬し、振とうやピペッティングすることで細胞を基材から剥離させる。この過程において、タンパク質分解酵素であるトリプシンは基材に接着した細胞の仮足を分解する効果があるが、細胞をすべて剥離するためにはトリプシンによる剥離効果だけでは不十分である。このため、剥離の補助として振とうやピペッティングなどの物理的な刺激を利用する。なお、トリプシンを用いる場合には、培地に含まれる Mg^{2+} や Ca^{2+} などの二価の陽イオンが分解酵素の阻害剤として働くため、トリプシンを用いる前に十分に細胞を洗浄する必要がある。このトリプシン処理は、細胞の剥離と回収の方法として広く一般的に用いられている。Umegaki ら[42]はトリプシン処理による細胞の剥離方法は、素早く細胞を剥離可能であるが、一方で細胞の増殖性を低減させると報告している。一般的にブタの膵臓から生成される酵素であるトリプシンは、安価で培養基材から細胞の仮足を分解する能力も高い。しかし、タンパク質分解酵素であるトリプシンは加水分解により細胞膜を損傷する危険性がある[43-45]。Revel [46]らはトリプシン処理後の細胞を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察し、細胞の周囲に存在する ECM だけでなく、細胞骨格も分解されることを確認した。また、Hirai [47]らは長時間のトリプシン処理により、次に細胞分裂するまでに要する時間が増加すると報告している。このように、トリプシンの使用は細胞に損傷を及ぼすことが古くから懸念されている。

(ii) コラゲナーゼ

コラゲナーゼは主にコラーゲンを分解する酵素であり、コラゲナーゼの分解能力はトリプシンよりも緩やかである。また、コラゲナーゼはトリプシンと違い Mg^{2+} と Ca^{2+} などの二価の陽イオンが阻害剤として働かない性質から、培地と混合して用いることができる。これらの性質から、コラゲナーゼは一般的に細胞を組織から単離するために用いられる[48, 49]。Kloskowski ら[50]はウサギの膀胱から尿路上皮細胞を単離するために異なる 4 種類の細胞単離方法を用いたところ、トリプシンによる単離と比較してコラゲナーゼによる単離は多くの生細胞数を回収できると報告している。しかし、コラゲナーゼは

コラーゲンの分解速度が遅く、トリプシン処理と異なり特定のタンパク質のみを分解することから一般的に培養基材からの細胞の剥離・回収には用いられてない。

(iii) ディスパーゼ

ディスパーゼは微生物由来の酵素であり、トリプシンよりも分解が緩やかとなるように調整されたタンパク質分解酵素である。タンパク質の分解が緩やかなため、ディスパーゼは上皮細胞などの細胞間接着の強い細胞を細胞同士が互いに接着した細胞シート状態で培養基材から剥離[51, 52]するために用いられている。細胞シートは、1.1節で説明した培養皮膚などの組織を形成するときに用いられ、細胞同士が接着した状態である。このため、細胞密度は上限に達しており、この状態ではほとんど増殖しないため、細胞を増殖させる目的には用いられない。

1.4.2 物理的な方法

トリプシンやコラゲナーゼ、ディスパーゼなどの酵素処理は、細胞の表面や周囲のタンパク質を分解して細胞を剥離する。すなわち、酵素処理後の細胞の表面や周辺のタンパク質は分解されてしまい、接着時のタンパク質から変化する。このため、細胞の表面や周囲のタンパク質を分析する場合には、酵素処理により細胞を剥離、回収することは望ましくなく、タンパク質が変質しないように物理的に剥離することが望ましい。酵素フリーで物理的に剥離する方法として、セルスクレーパが一般的に用いられている。セルスクレーパは酵素を用いない代表的な細胞剥離方法のひとつである。セルスクレーパの先端にはゴムが取り付けられており、培養面を擦ることで細胞を物理的に剥離する。細胞への物理的な接触により、セルスクレーパは細胞を損傷して活性の低下や死滅[53, 54]を引き起こすため、継代のための細胞の剥離には用いられていない。

1.4.3 化学的な方法

細胞を傷つけずに培養基材から剥離、回収する方法として、酵素フリーでの細胞の剥離・回収方法が求められている。細胞の周囲のタンパク質を分解せず、かつ細胞を損傷させずに細胞を剥離する方法として、化学的に培養面の状態を変化させる方法がある。以下にこれまでに報告されている方法を説明する。

(i) 温度応答性ポリマを用いた方法

化学的な手法をセルスクレーパ以外で酵素フリーに細胞を剥離することができる方法として温度応答性ポリマの利用が報告されている。温度応答性ポリマは、温度変化によりポリマの末端形状が変化する高分子材料である。Fig. 1-10 に温度応答性ポリマを用いた細胞の剥離プロセスを示す。32 °C 以上の高温では細胞が接着する poly (N-isopropylacrylamide (nIPAAm))が収縮している (Fig. 1-10a) 。しかし、培養面を 32 °C より低温にすると poly (nIPAAm)が伸展することで細胞が剥離する (Fig. 1-10b) 。基材表面に温度応答性ポリマを修飾することにより、前述の性質を用いて細胞間の接着を維持した状態で細胞を ECM ごと剥離し、細胞をシート状に回収[55-57]することができる。このため、温度応答性ポリマをコーティングした培養基材を用いることで、酵素を用いることなく細胞を培養基材から回収することができる。温度応答性ポリマの基材を用いて腎臓[58]や上皮[59]、角膜[60]などの細胞から細胞シートを形成する試みが報告されている。さらに、細胞シートを複数重ねることで多層の細胞組織を形成[61, 62]することができる。Ngo ら[63]は、温度応答性ポリマにより形成した多層状の筋芽シートに上皮シートを重ねて、生体内に近い状態の細胞組織を形成して、細胞組織の挙動を観察した。このように温度応答性ポリマは細胞シートを形成するための方法として現在、広く用いられている。しかし、細胞を回収するまでに 30 分以上必要であるため、長時間の温度低下による細胞の損傷が懸念されている。

(ii) 金-チオール反応を用いた方法

温度応答性ポリマのように酵素フリーで細胞を剥離、回収できる方法として金-チオール反応による剥離がある。これは、負電位を金基材に印加してオリゴペプチド層を金基材から還元脱離する反応を用いて接着性細胞を剥離させる方法である[64]。具体的には、このオリゴペプチド層 (CGGGKEKEKEK[65]) は、金基材表面に結合するためのシステイン配列 (C) , アルカンチオール自己組織化単分子膜を形成する配列 (KEKEKEK) , 細胞を接着するための配列 (GRGDSP) から構成されている。負電位を印加することで金基材とシステイン配列の結合が切断され、オリゴペプチド層とともに細胞も金基材表面から剥離する現象が起きる。この剥離方法は 5 分程度で細胞を金基材から剥離可能である。Kageyama ら[66]は血管構造を細胞組織内に形成するために、金メッキを施した金属棒に血管内皮細胞を培養し、細胞組織内で金-チオール反応による剥離を用いて血管内皮細胞を丸棒から剥離して血管組織を形成した。この方法は剥離に必要な時間が短く、細胞を損傷せずに剥離することができる。しかし、培養基材に金メッキを施す必要があり、培養基材が金に限定されるという欠点がある。すなわち、基材が光を透過しないた

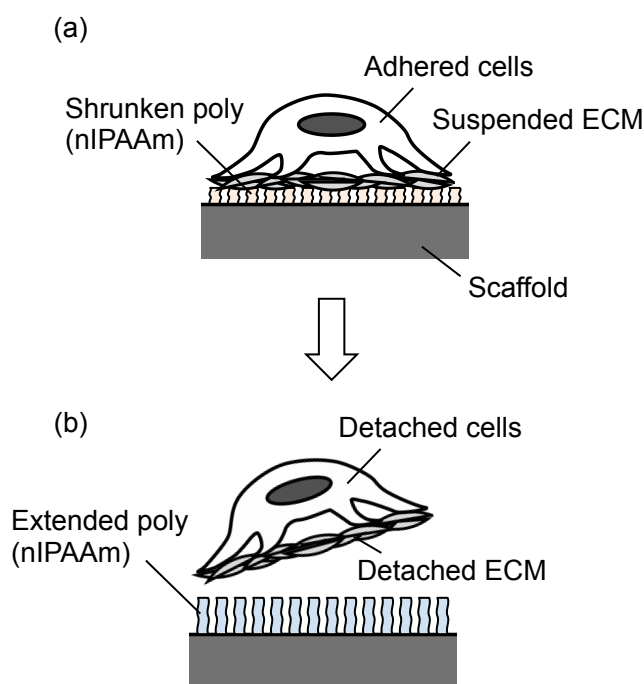


Fig. 1-10 Schematic illustration of cell detachment sequence by using temperature-responsive polymer. (a) ECM and cell adhere to poly (nIPAAm), when poly (nIPAAm) is shrunken above 32 °C. (b) ECM and cell detach from poly (nIPAAm) when poly (nIPAAm) extends below 32 °C .

め、位相差顕微鏡を用いることができず経時観察が困難である。また、金を使用することから、ディスプレイ製品に利用することもコスト面から困難であるといえる。

1.5 細胞培養の効率化

接着性細胞を大量に増殖させるためには、培養基材に接着した細胞を剥離、回収して再度播種、培養する継代作業が必要である。細胞は一般的に技術者の手作業により培養、継代されるが、再生医療の治療に用いる場合には、莫大な量の細胞を継代しなければならない。このため、自動培養システムに代表される細胞培養システムの開発が行われている。本節では、これらの細胞培養システムについて紹介する。

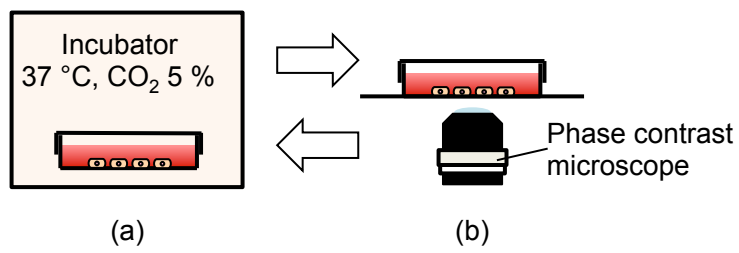
1.5.1 自動細胞培養システム

細胞を再生医療の治療に用いるためには莫大な細胞が必要となる。一般的に再生医療に iPS 細胞を用いる際には、 10^9 から 10^{10} 程度の安定した細胞の供給が不可欠である[17]。このように、大量の細胞を獲得するために自動細胞培養システムが盛んに開発されている。Thomas ら[67]や Nakajima ら[68]はロボットハンドを利用した汎用的な自動細胞培養システムを製作した。Fig. 1-11 に Nakajima らが開発した自動培養システム (Auto Culture, Kawasaki Heavy Industries, Tokyo, Japan) を示す。この自動培養システム ($2200 \times 1400 \times 2100$ mm) で行う細胞培養操作の汎用性は高いが、手作業をロボットアームに代替させただけに過ぎず、装置が巨大化してしまう問題がある。Fig. 1-12 に自動培養システムを用いた際に行われる一連の動作である細胞の観察、培地の交換、細胞の継代に要するプロセスを示す。細胞の観察や培地の交換は数段階の単純なプロセスで行うことができるが、細胞の継代には複雑なプロセスが必要である。このため、細胞を継代するためには様々な装置を必要とし、とくに細胞の剥離を行うために一般的な自動培養システムには極めて大きな振とう機を搭載している。すなわち、細胞の剥離や回収を含む継代の複雑なプロセスをロボットに代替させることが装置の巨大化を引き起こす最も大きな原因といえる。

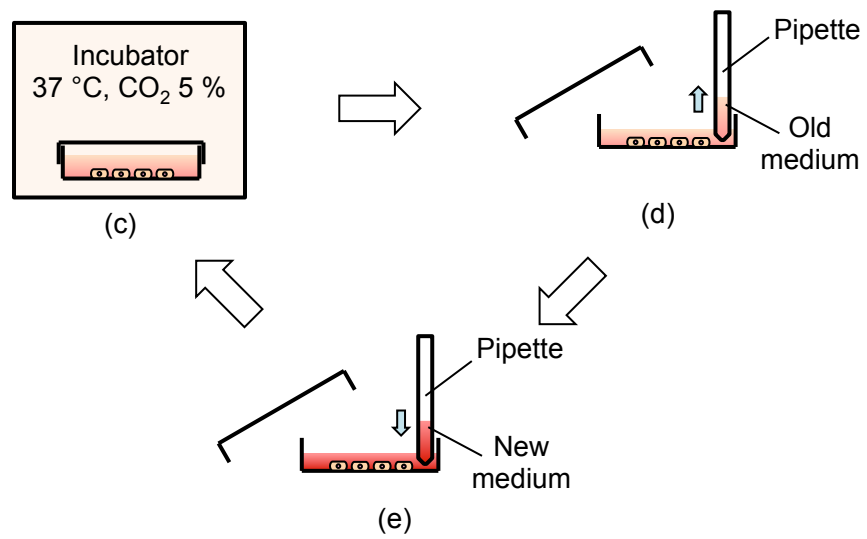


Fig. 1-11 Image of Auto Culture made by Kawasaki Heavy Industries. Human silhouette as control is 180 cm (https://www.khi.co.jp/auto_culture/).

(a) and (b) Observing process



(c) – (e) Changing medium process



(f) – (o) Subculture process

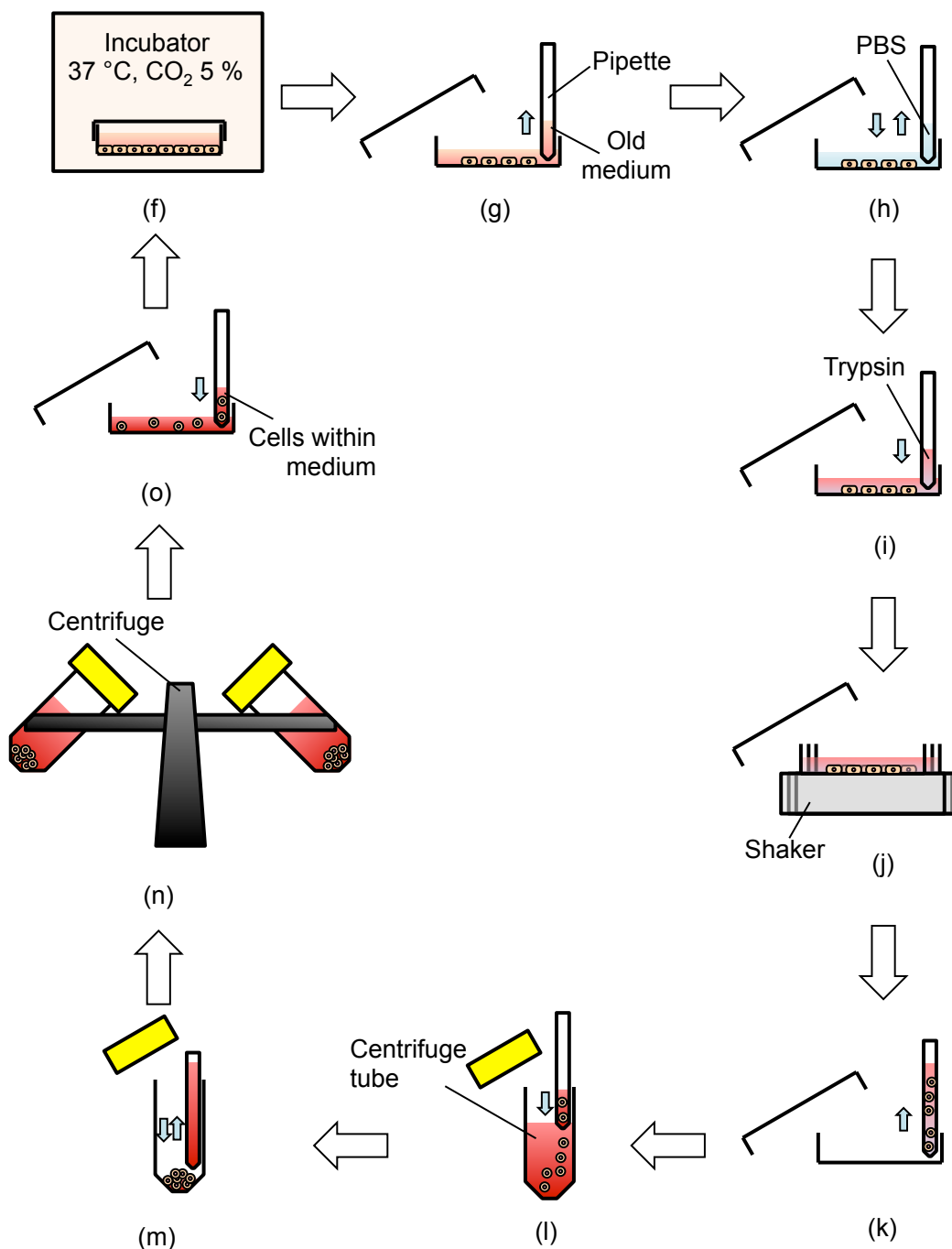


Fig. 1-12 Each operation processes in cell culture by using auto cell culture machine. (a) and (b) are processes for observing cells on cell culture dish. (c) – (e) are processes for changing old medium to fresh medium every a few days. (f) – (o) are processes for subculture when cell density comes closer to confluent. (a), (c) and (f) are shown cell culture phase in incubator (37 °C, CO₂ 5 %). (d) and (g) are shown that old medium is sucked out by a Pasteur pipette. (e) is adding fresh medium. (h) Cells are washed by Phosphate-buffered saline (PBS). (i) is adding trypsin. (j) Cells are shaken by orbital shaker to detach. (k) Cells are retrieved by a pipette and (l) moved to a centrifuge tube. (n) Periodically cell suspensions need centrifugation to increase the concentration of cells. (m) Medium are removed by a Pasteur pipette. (o) A part of cells in (p) are speeded to new flasks.

1.5.2 その他の細胞培養システム

自動細胞培養システム以外にも細胞培養を効率化するための装置は数多く考案されており，これらの概要について説明する．

(i) 中空糸モジュール

自動培養システムの汎用性を制限し，自動化する培養プロセスを播種と培養に限定することにより培養システムの小型化を図ることができる．中空糸モジュール[69]は小型化に成功した培養装置の一例である．中空糸モジュールは Fig. 1-13 の模式図に示すように細胞培養モジュール，培地ボトル，ポンプ，ガス交換機から構成されている．細胞培養モジュールはモジュール内に無数の中空糸を張り巡らせている．これにより，細胞が中空糸に絡まり，培地を循環させた際にも細胞は流れずにモジュール内に留まる．このように培地を循環することで，新鮮な培地を細胞に供給し，培地交換の作業を省くことができる．また，培地が循環して系が閉じていることから，コンタミネーションのリスクも低減できる．Housler ら[70]は造血幹細胞（HSC）前駆細胞を中空糸モジュールで培養し，培地を循環させることで発生するせん断応力により細胞の分化を促進させたことを報告している．しかし，剥離と回収は手作業で行わなければならない，さらに中空糸モジュールによる接着性細胞の培養では細胞が中空糸に絡みついたために細胞を剥離，回収することが難しい．このため，浮遊性細胞や接着性の弱い接着性細胞だけを対象として使用されている．

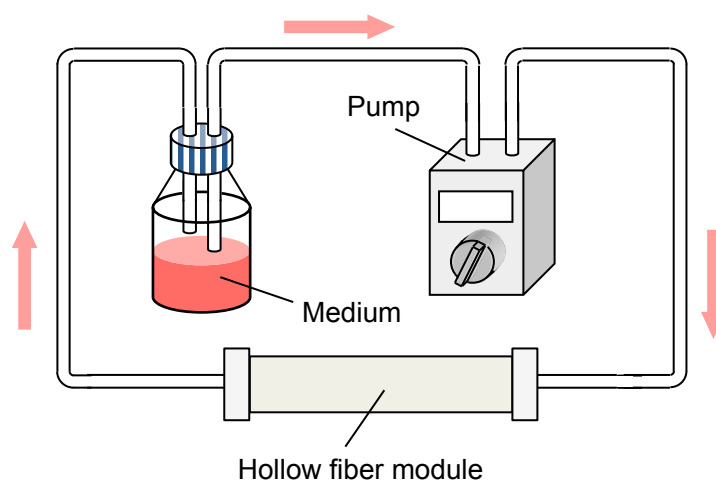


Fig. 1-13 Illustration of hollow fiber cell culture module.

(ii) スピナーフラスコ

スピナーフラスコ (Fig. 1-4a) は従来、浮遊性細胞の培養[21]に用いられていた。しかし、最近では iPS 細胞をはじめとする接着性細胞の大量培養への応用としてスピナーフラスコによる接着性細胞の浮遊培養[71, 72]が注目されている。この場合、接着性細胞はスピナーフラスコ内で細胞塊を形成して増殖する。ただし、これらの細胞は接着性細胞であり、フラスコ底面に接着させずに培地中を漂わせる必要があるため、絶えず培地を攪拌する必要がある。この方法では、接着性細胞を 3 次元的に培養することができるため、培地量に対する培養できる細胞数の割合が一般的な単層培養と比較して飛躍的に向上し、効率的に培養することが可能である。しかし、細胞塊が大きくなるにつれて、細胞塊の中心付近の細胞は栄養不足[73]や接触障害[41]を引き起こすため、単層培養に用いる T フラスコ (Fig. 1-4b) よりも細胞の増殖性や活性が低下する。これらの問題を解決するために 1.1.1 で先述したように、ナイロンフィルタを使って細胞塊を小さく維持[18]して、個体差が生じないようにするなどの工夫が行われているが、細胞塊の内側と外側の細胞で環境にばらつきが生じてしまうために、均一な細胞を培養することは困難である。また、細胞を単体で回収したい場合には、細胞同士が接着した細胞塊から細胞を一つずつに単離することは難しく、効率的に単離した細胞を回収することができていない。

1.6 細胞培養における超音波振動の応用技術

トリプシンを用いた細胞の剥離、回収方法では、細胞膜を損傷し、細胞の活性を低減させてしまう。自動培養をはじめとする細胞の大量培養には、酵素を必要としない細胞の剥離、回収方法が求められている。しかし、酵素フリーで回収できる温度応答性ポリマや金-チオール反応を用いた剥離方法は、細胞を培養する培養基材に特殊な材料を用いる必要がある。一般的に行われている継代方法に導入することは困難である。そこで本研究では、細胞を剥離するための方法として超音波振動に着目した。生物工学の分野では、古くから細胞を破壊して DNA やタンパク質を抽出するための方法 (ソニケーション[74]) として超音波振動を用いているが、生細胞を破壊せずに超音波振動を照射することは比較的新しい試みである。本節では、これまで細胞に用いられてきた超音波振動技術について説明する。

1.6.1 遺伝子導入への応用

ソニケーションに用いられる超音波振動は細胞懸濁液にキャビテーションを発生させて、細胞を破壊する。キャビテーションとは、超音波振動により水中に圧力差が生じ、短時間に泡の発生と消滅が起きる現象である。このとき、発生する泡が崩壊することにより、瞬間的に大きな衝撃圧力が発生する。これが細胞を破壊する原因である。近年では、このキャビテーションを遺伝子導入に応用する方法が確立された。

遺伝子導入は iPS 細胞の樹立や遺伝子治療を行うために必要な技術である。従来、遺伝子導入はレトロウイルスやアデノウイルスにより行われてきたが、これらは遺伝子変異による細胞のがん化やウイルス感染による細胞毒性のリスクから安全性が問われてきた。このことから、超音波を利用したソノポレーションによる遺伝子導入方法 (Fig. 1-14) が提案された。ソノポレーションでは、キャビテーションにより微小な泡を発生させて、これを細胞に照射することで細胞膜に穴を空け、そこから遺伝子を導入する方法である[75, 76]。このように、キャビテーションの規模を適切に制御することで細胞を死滅させずに、遺伝子導入に用いることができる。

1.6.2 細胞活性の向上への応用

超音波技術の発展により近年では超音波振動の出力を調節して、細胞の活性化に用いられている。生体への超音波振動の応用先として、1990年代から超音波振動は骨折治療に有効であると報告され始めた。Heckman ら[77]は超音波振動を照射することで未照射群と比較して脛骨の骨折治療に要する時間が 37.8%短縮したと報告している。また、Kristiansen ら[78]は超音波振動を照射することで未照射群と比較して橈骨の骨折治療に要する時間が 37.7%短縮されたと報告している。彼らはキャビテーションの発生しない低出力の超音波パルス (LIPUS) を骨折の治療に用いた。LIPUS を骨折部位に照射すると軟骨の成長が促進されて軟骨性骨の骨形成が早まることが報告されている[79]。この治療方法は、現在では我が国でも保険適応されており、Fig. 1-15a に示す専用の超音波振動照射装置である SAFHS (SAFHS[®] 4000J, TEIJIN Limited., Osaka, Japan) も販売されている。

これに付随して、Fig. 1-15b に示すように LIPUS を用いた培養細胞の活性を向上させる研究が数多く報告されている。とくに、軟骨細胞[80]や骨芽細胞[81, 82]については、増殖性やコラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生能力が向上することが報告されている。メカニズムは明らかでないが、超音波振動が軟骨細胞や骨芽細胞に機械的刺激[83]として作用し

ているためであるといわれている。

1.6.3 細胞マニピュレーションへの応用

近年，細胞マニピュレーションの方法として，マイクロデバイス内に超音波振動を励振して，細胞を培養面に幾何学的に配置する研究[84-87]が報告されている．超音波振動から発生する音響流による細胞マニピュレーション[88, 89]はそのひとつである．例えば Friendらの研究グループでは，弾性表面波（SAW）による音響流を用いて微小なチップ上の液滴内に渦を発生させ，せん断応力により粒子や染色液を液滴の中心で凝集させる技術[90-92]に応用し，細胞を集積させる研究[93-96]を複数報告している．

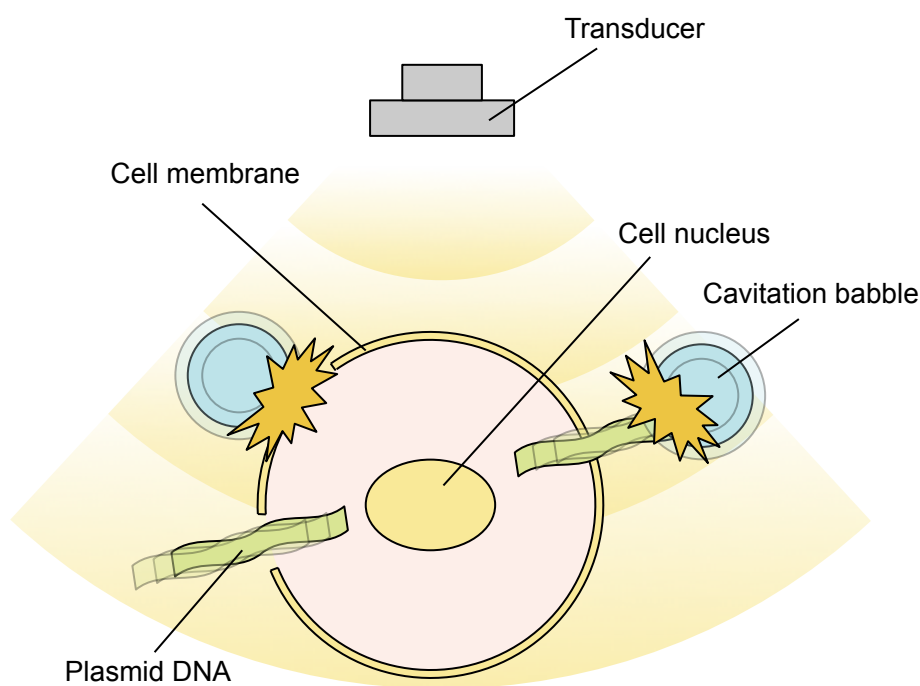


Fig. 1-14 Schematic illustration of transgenics by using sonoporation.

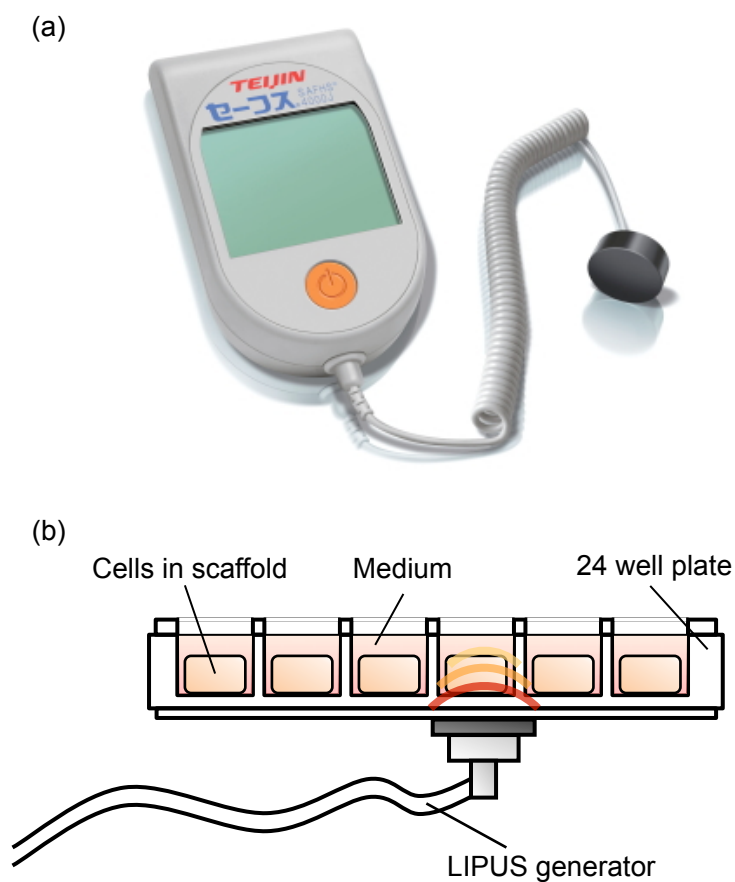


Fig. 1-15 Application of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS). (a) Fracture-hearing equipment: SAFUS. (b) An experimental procedure exposing LIPUS to cells (<http://medical.teijin-pharma.co.jp/zaitaku/product/safhs4000j/>).

また、音響流以外にも、圧電素子に励振された固有振動から発生する定在波を用いて細胞をマイクロプレート上にマニピュレートする研究が行われている。Wiklundら[97, 98]の研究グループでは、振幅変調した超音波振動によるマニピュレーションを用いてマイクロプレート上の100個のウェルの中にそれぞれ少量の細胞や粒子を配置した。これらの方法は、キャビテーションが発生しない条件下で超音波振動を使用しており、細胞を損傷させずにマニピュレーションを可能としている。

以上のように、超音波振動を制御することで細胞を死滅させずに、細胞を操作できる技術が多数報告されている。

1.7 本研究の目的

本章では、再生医療の現状と細胞培養技術の詳細について述べた。1.1 節では、近年の再生医療の発展に追従した細胞培養技術の進歩と、それにとまなう高効率な大量培養技術を確立することの必要性を説明した。つぎに、1.2 節では、細胞を培養するために必須の 3 大要素について言及した。また、1.3 節では、細胞の培養プロセス全体について説明し、この中でも細胞の剥離と回収の方法に焦点を当て、1.4 節では現在一般的に用いられている細胞の剥離方法であるトリプシンとその他の剥離方法を詳細に述べた。1.5 節では、細胞培養の効率化を目標として開発された自動培養システムをはじめとした培養システムについて説明した。培養システムを用いる際にも、酵素による剥離、回収を行っており、その方法は従来と変わらないといえる。すなわち、接着性細胞の培養効率を向上させるためには、細胞の剥離、回収方法を改善して細胞の活性を維持することが重要である。このため、細胞を剥離する方法として超音波振動に着目し、1.6 節では細胞工学に従来用いられてきた超音波技術について述べた。従来の細胞工学から、超音波振動を適切に制御することで細胞を死滅させずに、細胞操作を行うことができることを確かめた。

以上のことから、細胞の活性を維持して培養を続けるためには細胞の剥離、回収方法の改善が必要であり、これを実現するために本研究では、基材に対して効率的に振動を発生できる固有振動に着目した。すなわち、本研究の目的を、培養基材の固有振動を励振できる細胞培養デバイスを具現化し、超音波域の固有振動により細胞を剥離する手法を確立することとした。具体的には、はじめに固有振動を励振するための培養基材の材料の選定を行い、細胞増殖性に優れた培養面を表面改質により形成し、これを用いた細胞培養器を製作する (2 章)。つぎに、固有振動とトリプシンを組み合わせ、異なる振幅の固有振動を励振した際の細胞の回収率を調べる (3 章)。さらに、基材の固有振動とコラゲナーゼと組み合わせ、接着性細胞の剥離を試み、細胞の回収率や剥離、回収した細胞の増殖性を明らかにする (4 章)。また、酵素による細胞の損傷を避けるため、固有振動と冷温刺激を組み合わせ、酵素フリーでの剥離を試み、細胞の回収率を確かめる (5 章)。以上の研究から、細胞工学の知見として、細胞を剥離するために必要な条件を検討し、さらに機械工学の知見として、高効率に細胞を培養するための条件を求める。これらの知見をまとめて、6 章に結論を示す。

2 金属製細胞培養器

本章は、培養基材に効率よく固有振動を励振できる細胞培養器を製作することを目的とする。具体的には、まず培養基材として、振動効率の優れた材料の中から生体適合性に優れた材料を選定し、選定した培養基材に表面処理を施す。その培養基材の上で培養した細胞の増殖性と接着挙動について検討し、表面処理が細胞の活性に及ぼす影響を確かめる。その後、これを用いて細胞培養器を製作し、製作した細胞培養器の有効性を確かめる。

2.1 培養基材の材料の選定

本研究では、細胞の剥離のために培養基材に固有振動を励振することを提案する。固有振動を効率よく励振するためには機械的 Q 値 (Quality factor) の高い材料が優れている。機械的 Q 値とは、

$$Q = \frac{\omega_0}{\omega_2 - \omega_1} \quad (1)$$

で定義される無次元数である。ここで、 ω_0 、 ω_1 、 ω_2 はそれぞれ共振ピークでの共振周波数、共振ピークの左側 (低周波数側) において振動エネルギーが共振ピークの半値となる周波数、共振ピークの右側 (高周波数側) において振動エネルギーが半値となる周波数である。一般的に、金属材料は、ガラス材料や高分子材料と比較して Q 値が高く、振動効率に優れた材料であるといえる。このため、本研究では金属材料を接着性細胞の培養材質に選定することとした。

1.2.2 で説明したように、バイオマテリアルとして汎用的に用いられている金属材料にステンレス鋼 (SUS316L) やチタンなどがあるが、本研究では、比較的安価で加工性に優れた SUS316L を用いることとした。SUS316L の化学成分を Table 2-1 に示す。接着性細胞の培養基材とするためには、培養ディッシュやフラスコで培養された接着性細胞と同等の活性を有する細胞を培養できる培養基材を作る必要がある。一般的な培養ディッシュやフラスコなどの培養基材では、1.2.2 に示したように細胞の接着率を高めるための表面改質が施されており、細胞の活性を維持することができる。本研究で用いる培養器も同様に細胞の活性を維持するための培養基材である必要がある。

Table2-1 Chemical composition of stainless steel alloy 316L (wt %).

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

2.2 培養基材の表面改質

金属基材の表面改質には、様々な方法がある。たとえば、Abdal-hay ら[99] はポリカプロラクトン (PCL) とポリ乳酸 (PLA) を複合した生分解性膜をチタン表面にコーティングし、その上で骨芽細胞 (MC3T3-E1) を培養すると細胞の増殖性は未処理面と比較して向上することを報告している。しかし、この生分解性膜のコーティングには、チタン基材に PLA 溶液と PCL 溶液を塗布後、12 時間 37 °C 雰囲気下で乾燥させる必要がある。このように、高分子膜を金属培養基材にコーティングする方法では、処理プロセスが複雑であり、また基材からコーティングした膜が剥離することが懸念される。したがって、このような方法を用いることなく、細胞の培養面としての基材自体の表面特性を向上させる手法の確立が重要と考えられる。

基材自体の表面特性を向上させる手法の 1 つに、細胞が接着する基材に凹凸を加工する試みが報告されている。たとえば、Lee ら[100]はエッチングにより細溝を加工したチタン培養試験片上でヒト由来の細胞を培養して増殖性と分化能力を評価した。その結果、歯肉線維芽細胞の増殖性が向上することと、骨髄間質細胞と歯根膜線維芽細胞の骨芽細胞への分化誘導が促進されることを報告している。これ以外にも、エッチング[101, 102]やワイヤ放電加工[31], サンドブラスト[103]により金属基材に凹凸を加工した表面で細胞培養を行うと、培養基材の凹凸に依存して細胞の活性が向上することが報告されている。

本研究では、細胞の培養基材の表面処理手法として、簡便なプロセスでありながら、種々の特徴を有する凹凸を容易に加工できる微粒子ピーニング (FPP) 処理に注目することとした。亀山ら[36]は Ti-6Al-4V 基材に三酸化タングステン粒子を投射して凹凸を有した培養試験片を準備し、その上でヒト由来骨髄間質細胞 (KM102) を培養して LDH 活性を測定した結果、凹凸を加工した基材で培養した細胞の生存率が未処理面で培養した細胞と比較して

向上したことを報告している。さらに、長井ら[35]は、Ti-6Al-4V 基材に微粒子を投射して凹凸を有した培養試験片を準備し、マウス由来線維芽細胞 (L929) を培養して細胞の接着性と増殖性を評価した。その結果、FPP 処理を施した培養試験片上で培養した細胞の接着性や増殖性が鏡面研磨を施した培養試験片上で培養した細胞と比較して向上したことを報告している。以上のように、培養基材に FPP 処理を施し、凹凸を加工した培養基材では、細胞の増殖性や接着性が向上することが報告されている。このため、2.1 節で選定した SUS316L 基材で培養した細胞の活性の向上を目的に、SUS316L 試験片の表面に FPP 処理を施して、その上で培養した細胞の増殖性や接着挙動を評価した。

2.2.1 微粒子ピーニング (FPP) 処理を施した基材の製作

基材には、先述した SUS316L を用いた。ディスク状 (直径 15 mm, 厚さ 4 mm) に高速砥石切断機 (HS-45AC ファインカット, 平和テクニカ株式会社, 神奈川, 日本) を用いて機械加工した同材の一方の端面を、エメリー紙 (#240~#1200) を用いて研磨した。その後、粒径 20~50 μm 程度のシリカ (SiO_2) 粒子 (ガラスビーズ, 不二製作所, 東京, 日本) とアルミナ (Al_2O_3) 粒子 (アルミナ, 不二製作所, 東京, 日本) を用いてピーニング装置 (ニューマ・ブラスター, 不二製作所, 東京, 日本) により FPP 処理を施した。Fig. 2-1 に走査型電子顕微鏡 (SEM) (S-4700, 株式会社日立ハイテクノロジーズ, 東京, 日本) により観察した投射粒子を示す。また FPP 処理条件を Table 2-2 に示す。この条件にて、シリカ粒子を用いて処理した試験片 (S_s) およびアルミナ粒子を用いて処理した試験片 (S_a) を準備した。また、比較のために鏡面状に研磨した試験片 (S_p) も準備した。

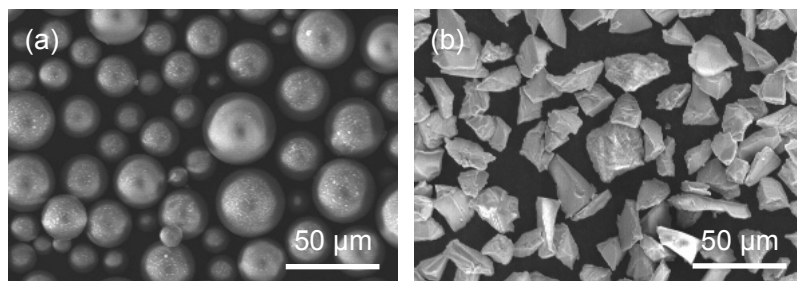


Fig. 2-1 Typical features of (a) SiO_2 and (b) Al_2O_3 particles.

Table 2-2 Condition of FPP treatment.

Peening pressure, MPa	0.6
Peening time, s	30
Nozzle distance, mm	100
Shot particle	SiO ₂ , Al ₂ O ₃
Particle supply rate, g/s	1

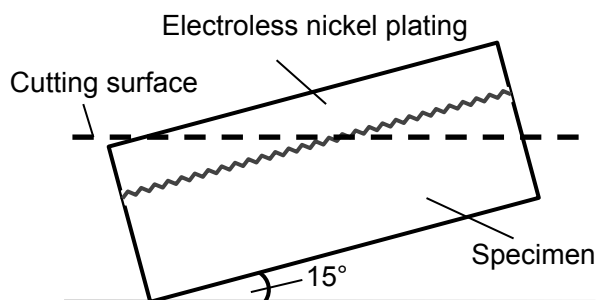


Fig. 2-2 Schematic illustration of tapered section method.

2.2.2 基材上の凹凸の観察

各試験片の表面粗さをレーザ顕微鏡（VK-9710，株式会社キーエンス，大阪，日本）により測定し，基材表面に形成された凹凸の状態を SEM と光学顕微鏡（GX51，オリンパス株式会社，東京，日本）を用いて観察した．なお，光学顕微鏡による観察では，表面にニッケルメッキを施し，基材表面の凹凸を保護した後，斜め切断法（傾斜角 15°）により断面を準備（Fig. 2-2）して観察した．

Fig. 2-3 に各試験片の算術平均粗さ（ Ra ）をレーザ顕微鏡（VK-X120，株式会社キーエン

ス, 大阪, 日本) により測定した結果を示す. 同図から S_s の凹凸は S_a の凹凸と比較して大きいことがわかる. また, 約 30° 傾けた状態で SEM により観察した試験片表面を Fig. 2-4 に示し, 光学顕微鏡により観察した表面近傍の試験片断面を Fig. 2-5 に示す. これらの図と投射粒子の形 (Fig. 2-1) から, 投射粒子に依存して特徴の異なる凹凸が形成されることがわかる. 具体的には, S_s の表面は比較的なめらかな低周波の凹凸が形成されていること, S_a では比較的高周波な微視的凹凸が形成されていることがわかる. Fig. 2-6 にこの様子を模式的に示す. 同図には同スケールで投射粒子の模式図も描かれており, 微粒子の形状が転写されるように凹凸が形成されることを示している.

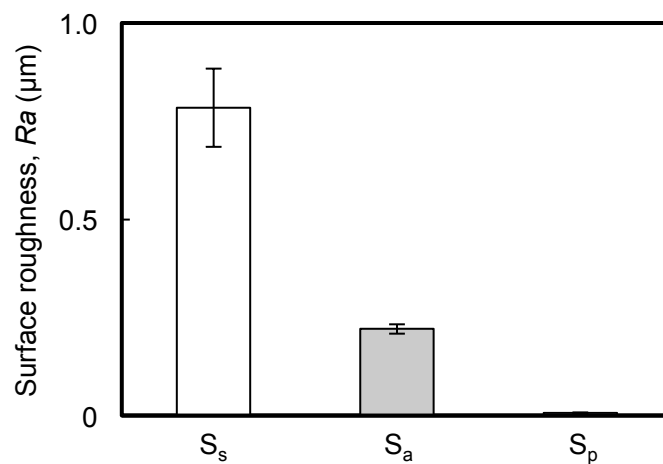


Fig. 2-3 Surface roughness of specimen treated by FPP with silica, S_s , and alumina, S_a , particles, and polished mechanically, S_p .

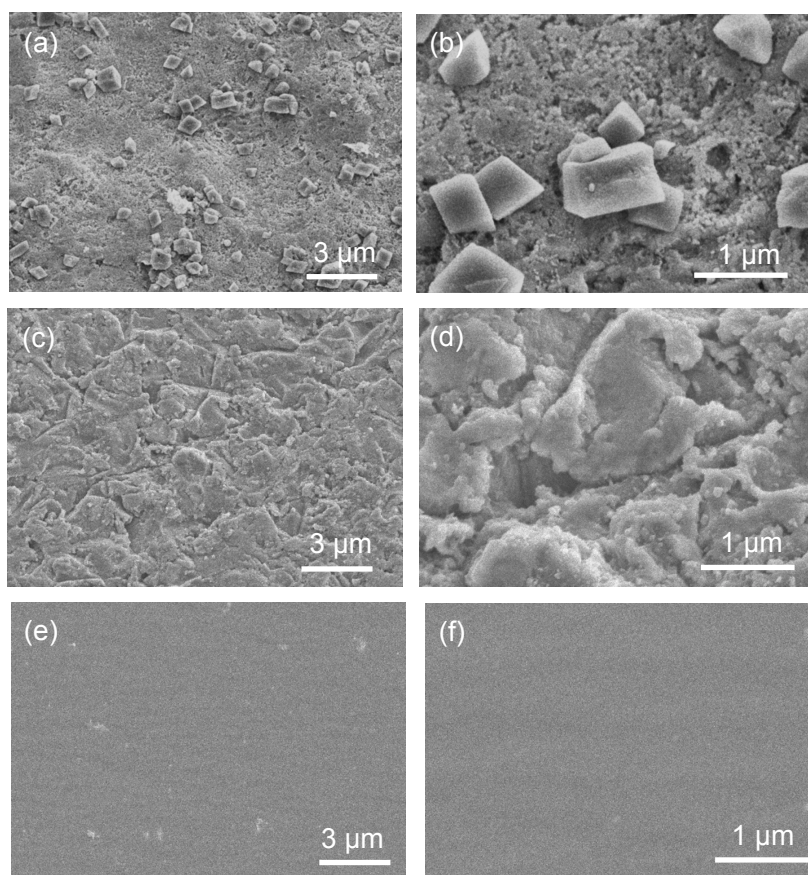


Fig. 2-4 Typical feature of specimen's surface. Note that (a) and (b) are the images of FPP treated surface by using SiO₂ particles, (c) and (d) are the images of FPP treated surface by using Al₂O₃ particles, and (e) and (f) are the images of polished surface.

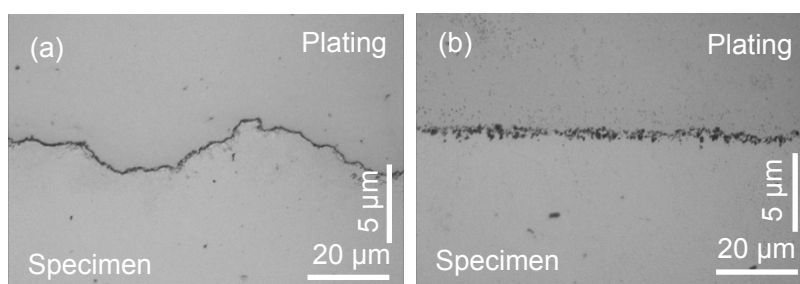


Fig. 2-5 Optical microscopic images of FPP treated surface by using (a) SiO₂ and (b) Al₂O₃ particles.

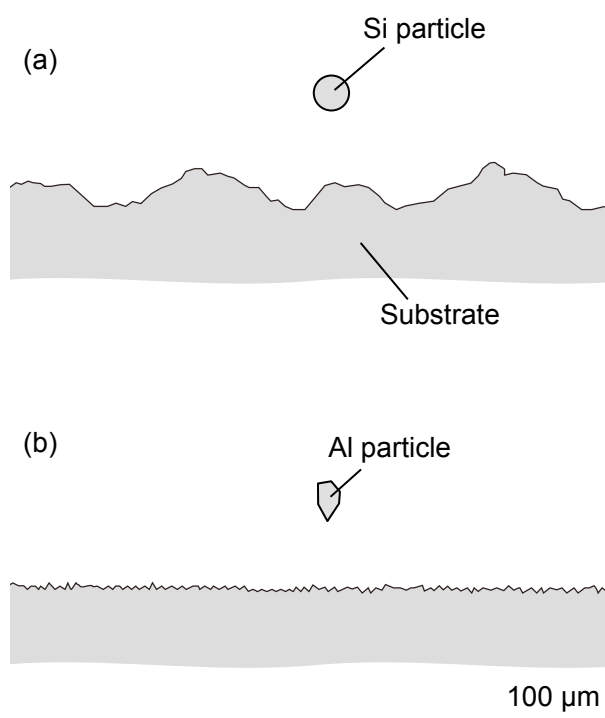


Fig. 2-6 Schematic surface roughness of FPP treated substrate with (a) Si and (b) Al particles.

2.3 細胞培養特性の評価実験の方法

2.3.1 培養面（基材）の準備

2.2.1に示したFPP処理を施した試験片の培養面を洗浄するために、エタノールに浸漬して超音波洗浄した。その後、オートクレーブ（121℃、2気圧、20分）（LBS-245, TOMY, 東京, 日本）により滅菌した。紫外線を照射したクリーンベンチ内で滅菌した試験片を乾燥させて、24ウェルプレートの底面に配置した。

2.3.2 細胞の準備

本実験では接着性細胞の一種である軟骨細胞を用いた。軟骨細胞は生後 4-6 週間の仔ウシの膝関節から採取した。膝関節の骨頭から軟骨細胞を 1 mm^3 のピース状の組織片に切除し、組織片をウシ由来血清 (FBS) (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, MO, US) を 10% 加えたダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物 F-12 ハム (D-MEM/Ham's F-12 with L-glutamine, phenol red, 和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) および抗生物質を添加した培地に一晩漬けた。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) で洗浄後、細かく砕き、先ほどの培地に 0.15% コラゲナーゼ (タイプ I) (C0130, Sigma-Aldrich, MO, US) を加えて、インキュベータ内 (37°C) (CPE-2601, 株式会社ヒラサワ, 東京, 日本) で 16 時間ゆっくりと攪拌した。溶解した溶液を $70 \mu\text{m}$ のナイロンメッシュフィルター (Cell strainers, Corning, NY, US) に通し、残存した破片を除去した。つぎに、細胞を遠心分離により懸濁液から単離し、PBS で 2 回すすいだ。この細胞を冷凍保存液 (バンバンカー, 日本ジェネティックス株式会社, 東京, 日本) に懸濁し、ディープフリーザ (-80°C) (My Bio, National Health Fund, Warszawa, Poland) 内で 1 日保存した後、液体窒素中に冷凍保存した。本実験では、この冷凍保存した細胞を解凍後、3 日に一度、3 回継代し十分に脱分化させた軟骨細胞を用いた。細胞を培養するための培地には FBS を 10% 加えたダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物 F-12 ハムを用いた。細胞の培養は 75 cm^2 フラスコ (90075, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) を用いて行い、フラスコに接着した細胞を PBS で 2 度洗浄し、トリプシン (0.05w/v% Trypsin-0.53mmol/l EDTA · 4Na Solution with Phenol Red, 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を散布して 3 分間インキュベータ (37°C , CO_2 5%) (CPE-2600, 株式会社ヒラサワ, 東京, 日本) 内で静置したのち、ピペッティングで回収して、継代を行った。

2.3.3 細胞の増殖性実験

異なる凹凸を有する試験片上で培養した軟骨細胞の活性を調べるために、細胞の増殖性を確認した。増殖性を確認するための培養試験の様子を Fig. 2-7 に模式的に示す。24 ウェルプレートの底面に配置された試験片 (S_s , S_a , S_p) の上で細胞培養試験を行った。増殖性の評価は、試験片上に 1.5×10^4 個の軟骨細胞を播種し、インキュベータ内で 72 時間培養後にトリプシンに 3 分間浸漬した後、ピペッティングで細胞を剥離、回収して血球計算盤 (A116, アズワン株式会社, 東京, 日本) により細胞数を測定することで行った。

2.3.4 顕微鏡による観察

細胞の接着の様子を調べるために、SEM と蛍光顕微鏡により細胞の様相を観察した。

(i) 走査型電子顕微鏡による細胞の仮足の観察

表面形状の違いが細胞の接着挙動に及ぼす影響について評価するために、試験片に細胞が接着している様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。なお、観察のための細胞試料を作るために凍結乾燥法[104]を用いた。具体的には、試験片上に 24 時間静置培養した細胞を 2.5% グルタルアルデヒド水溶液 (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) に 20 分間浸漬することで固定した後に、エタノール水溶液 (20, 50, 80%) に 15 分ずつ浸漬して徐々に脱水した。100% エタノールで洗浄した後、100% エタノールに 30 分間浸漬して、完全に脱水した。その後、*t*-ブチルアルコール (東京化成工業株式会社, 東京, 日本) に 15 分間浸漬したのち、新しい *t*-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を *t*-BuOH 凍結乾燥機 (VFD-21S, 株式会社真空デバイス, 茨城, 日本) により昇華させて細胞を乾燥させた。その後、オスミウムコーター (HPC-1S, 株式会社真空デバイス, 茨城, 日本) によりオスミウムを細胞試料にコーティングして、SEM で観察した。なお、加速電圧を 2.0 kV に設定した。

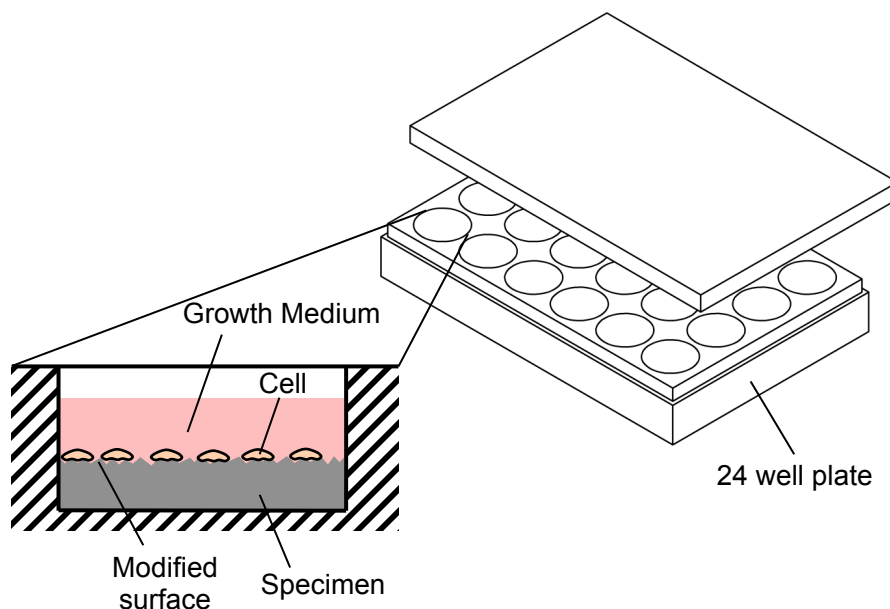


Fig. 2-7 Schematic illustration of cell assay composed of FPP treated surfaces.

(ii) 蛍光顕微鏡による細胞のアクチンフィラメントの観察

基材への細胞の接着挙動を調べるために、アクチンフィラメントを蛍光顕微鏡により観察した。細胞を観察するための前処理として、観察する細胞を固定するために、細胞を 2.5%グルタルアルデヒド水溶液に 20 分間浸漬し、細胞を完全に固定した後に界面活性剤 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, MO, US) に 15 分間浸漬した。その後、PBS に 1.0% ウシ血清由来アルブミン溶液 (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) と 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, MO, US), 0.02% アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) を添加して生成した BSA-PBST に 30 分間浸漬した。なお、ここまでの行程は細胞に蛍光染色液を浸透させるための下準備である。下準備を行った細胞試料をローダミン・ファロイジン溶液 (568 ファロイジン, Thermo Fisher Science, MA, US) に 1 時間浸漬してアクチンフィラメントを染色し、BSA-PBST を用いて十分洗浄した。なお、観察中も培養面を乾燥させないように BSA-PBST に浸した。

2.3.6 細胞の移動性実験

接着性細胞は、細胞同士が接触した際には、接触障害を起こさないように重なることを避けて移動する[105]。この移動が、細胞の活性や増殖性に影響を及ぼすものと考えられる。そこで本研究では、異なる微粒子を用いて FPP 処理を施した試験片表面の凹凸の違いが、細胞の移動のし易さに及ぼす影響について評価した。具体的には、Fig. 2-8a に示すようにシリコーンゴムにより 24 ウェルプレート (92024, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) のウェル内に仕切りを作り、初期接着箇所を中心部 (内径 4 mm) に限定した状態で細胞を播種した。中心部に接着している細胞を 2 時間インキュベータ内で培養した後、シリコーンゴムを取り外し (Fig. 2-8b), 72 時間インキュベータ内で培養した (Fig. 2-8c)。その後、蛍光顕微鏡を用いて、試験片表面の各部位での細胞の有無を観察した。なお、Fig. 2-9 に、蛍光顕微鏡により観察した箇所の説明図を示す。同図の観察領域 (0.16 mm^2) に観察できる細胞の数を測定し、中心からの距離と細胞数の関係性を評価した。

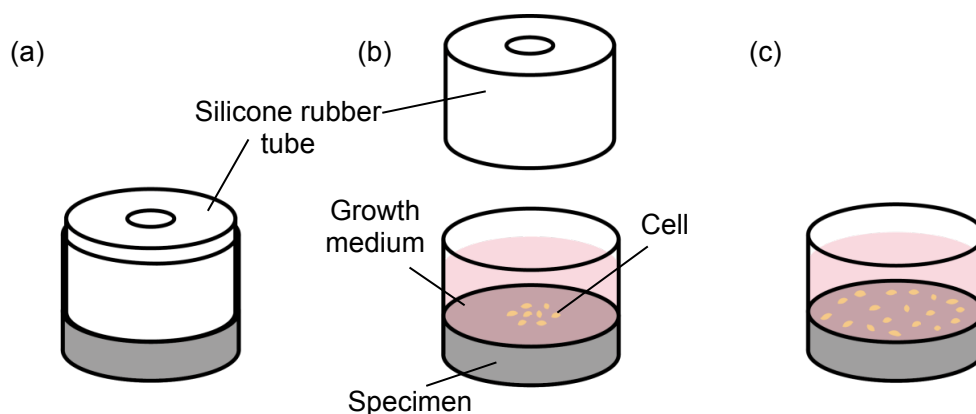


Fig. 2-8 Schematic illustration of the steps involved in cell migration assay.

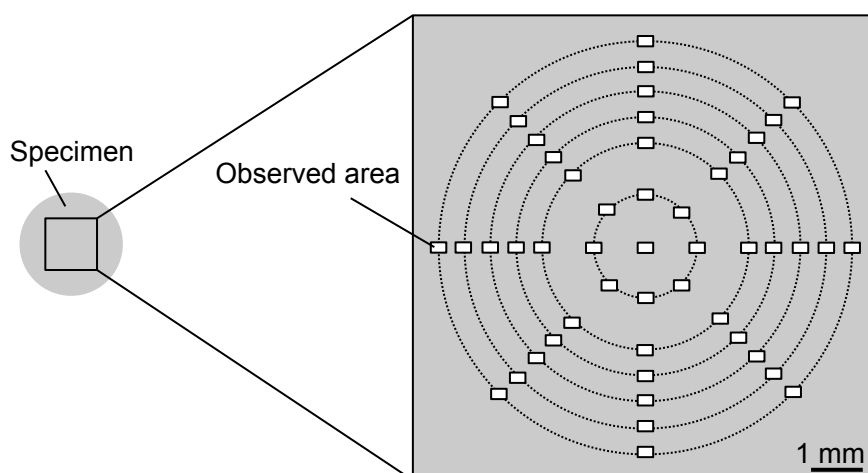


Fig. 2-9 Schematic illustration of observed areas.

2.3.7 アポトーシスの判別実験

細胞が密集している際には、細胞の増殖性が減少するだけでなく、細胞の分泌するサイトカインにより、アポトーシス（細胞死）が細胞に誘導される可能性がある。アポトーシスが起きるか否かを確認するために、各試験片上で 72 時間培養した細胞を FAM-FILICA in vitro Apoptosis Detection (FAM-XXX-FMK Kit, コスモ・バイオ株式会社, 東京, 日本) を用いて染色し、蛍光顕微鏡により観察した。

2.4 細胞培養特性の評価結果および考察

2.4.1 細胞の増殖性と接着挙動に及ぼす凹凸の影響

2.3.3 で述べた方法を用いて、細胞の増殖性を調べた。Fig. 2-10 に、各試験片上で軟骨細胞を 72 時間培養し、回収した細胞数を測定した結果を示す。同図より、培養初期に播種した細胞数より回収した細胞数が増加していることがわかる。これは、SUS316L 表面において軟骨細胞が増殖することを示すものである。また、試験片表面に凹凸を有する S_s と S_a では、鏡面状に研磨した S_p と比較して細胞数が有意に増加していることがわかる。しかし、 S_s と S_a の間にも細胞数に有意な差が認められる。これは接着性細胞である軟骨細胞は試験片上の凹凸の特徴の違いによって増殖性が変化したためと推測される。

凹凸の有無によって増殖性が変化した要因について調べるために、2.3.4 で述べた方法を用いて SEM により軟骨細胞から伸展した突起（微絨毛）の状態を観察した結果を Fig. 2-11 に示す。同図から、FPP 処理を施した S_s と S_a 上の突起の伸展が、 S_p に接着した細胞から伸展する突起と比較して顕著なことがわかる。とくに、増殖率が最も高い S_a に接着した細胞

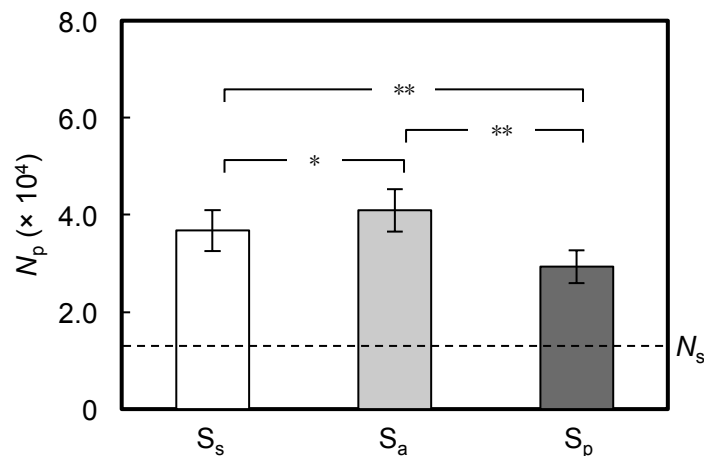


Fig. 2-10 Comparison of the number of proliferated cells, N_p . Cells are seeded to the specimens and cultured for 72 hr, and then collected by trypsinization and measured by haemocytometer. The number of seeded cells is 1.5×10^4 , N_s (mean \pm SD, $n = 10$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

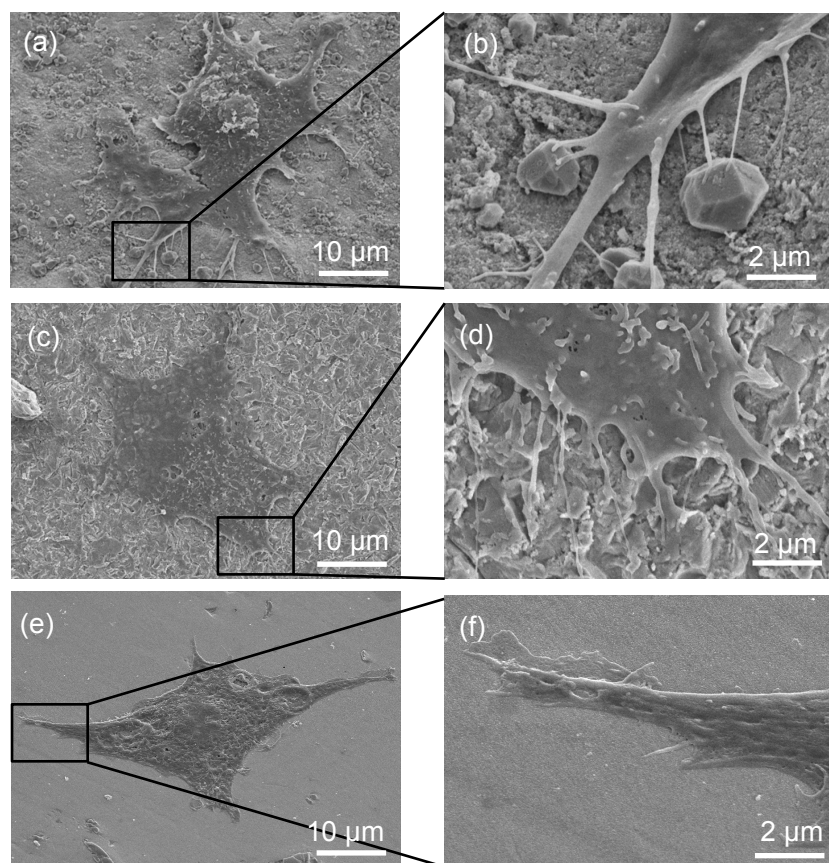


Fig. 2-11 Chondrocytes on substrate are imaged by SEM. Note that (a) and (b) are the images of cells adhered to S_s , (c) and (d) are the images of cells adhered to S_a , and (e) and (f) are the images of cells adhered to S_p .

の突起の数は他の細胞と比較して顕著に多い ((c), (d)). 細胞から伸展した突起の数が増加すると, 細胞の活性や増殖性が向上することが報告されている[106, 107]. すなわち, これは S_a に播種された細胞の活性が S_s や S_p と比較して向上していることを示すものである.

2.4.2 細胞移動に及ぼす凹凸の影響

一般的な細胞は、細胞同士が接触すると重なることを避けるために、互いに異なる方向に移動する性質を有しており、増殖する際も細胞同士が接着することのないように移動する[108, 109]。細胞が移動できない状況下では、接触障害が生じて増殖性の低下[110]や、サイトカインが分泌されることにより、アポトーシス[111]が起きることが知られている。このため、本実験で製作した試験片上でも接触障害を避けるように細胞は移動するものと推測される。そこで、2.3.5の方法を用いて、細胞が移動した後の分布を調べた。

Fig. 2-12 に、試験片の中心からの距離とその位置における細胞数を測定した結果を示す。なお、Fig. 2-12a 中の点線は初期に細胞を播種した際の境界を示している。すなわち播種直後には点線より試験片の中心に近い領域のみに細胞が接着している。Fig. 2-12a において、試験片の中心部分に注目すると、 S_s の細胞数が S_a および S_p と比較して少ないことがわかる。これは、Fig. 2-6a に示した低周波の凹凸が細胞の移動を阻害し、その結果、局所的に細胞密度が高まり、接触障害を起こしたことが原因と考えられる。さらに、細胞を播種した領域（試験片中心から半径 2 mm）よりも外側に移動した細胞について検討するために、Fig. 2-12b に、試験片中心から 2.5 mm および 3.0 mm 付近の細胞数を測定した結果を示す。同図より、 S_a および S_p において播種した領域の外側で観察された細胞の数は、 S_s と比較して有意に多いことがわかる。これは、低周波の凹凸を有する S_s 表面と比較して、高周波の凹凸を有する S_a 表面や平滑面を有する S_p で細胞が移動しやすいことを示唆するものである。

局所的に細胞密度が増加した要因を調べるために、72 時間培養後に試験片上に接着した細胞のアクチンフィラメントの観察を蛍光顕微鏡により 2.3.4 に示す方法で行った。その結果、 S_s の場合には、局所的に細胞が密集している箇所が認められた (Fig. 2-13a)。一方で、 S_a 上の細胞は一定の間隔を保つように試験片に接着していた (Fig. 2-13b)。Fig. 2-13a のように細胞が局所的に密集して試験片に接着した際に、アポトーシスを引き起こすかを検討するために、2.3.6 の方法を用いて検討した。その結果、すべての試験片においてアポトーシスが誘導されることを示す緑色の発光は観察されなかった。したがって、Fig. 2-12 に示した細胞数の減少の原因は、凹凸の形状に起因して細胞が局所的なコンフルエントとなり、その場で接触障害を発生して増殖性が低下したためと考えられる。

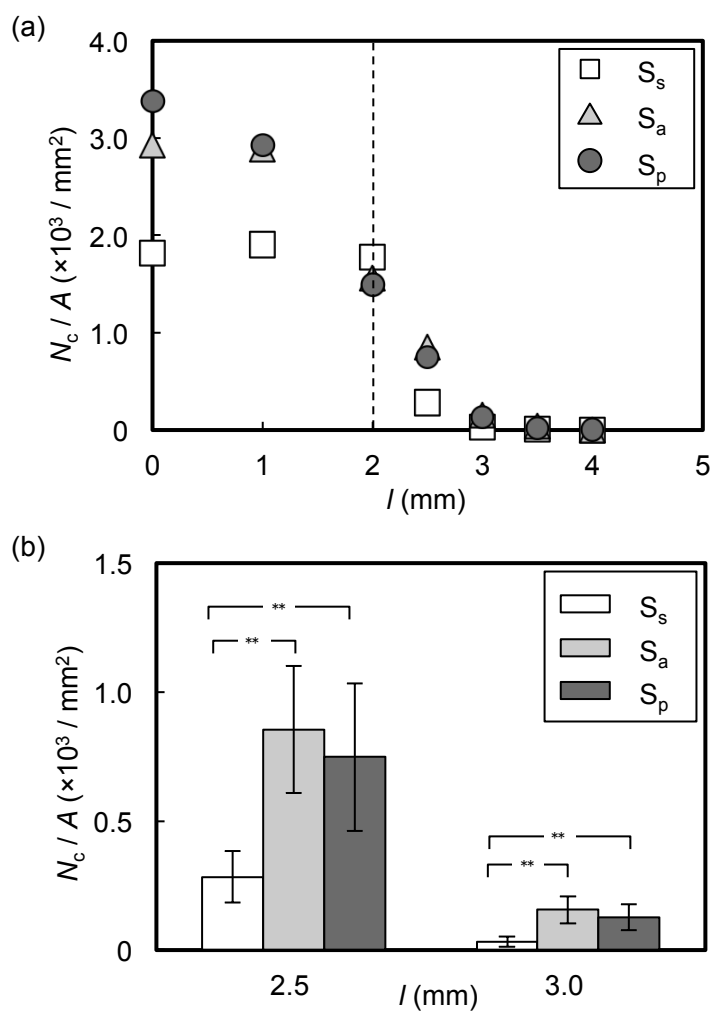


Fig. 2-12 Relationship between number of cells, N_c , and distance from center of substrate, l . Cell distribution on (a) the whole substrate and (b) 2.5 / 3.0 mm away from the center of substrate. Cell density is the number of cells, N_c , / observation area, A (mean \pm SD, $n = 8$, **: $p < 0.01$).

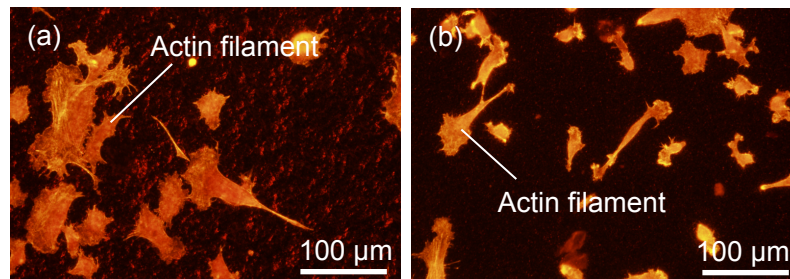


Fig. 2-13 Fluorescent micrographs of cytoskeleton actin filaments staining. Cells adhered on the FPP treated substrate by using (a) SiO_2 and (b) Al_2O_3 particles.

2.4.3 細胞培養に優れた微粒子ピーニング処理表面の選定

以上述べてきた結果に基づいて、異なる凹凸を有する試験片上で接着して増殖する細胞の様子を模式的に示したものが Fig. 2-14 である。同図では、細胞と試験片表面の凹凸の大きさが実際のサイズと同スケールで描写されている。S_a の場合には細胞の移動がし易いため、全体がコンフルエントになるまで増殖を繰り返す。これに対して、S_s の場合には、低周波の凹凸の凹部で局部的にコンフルエントになるため増殖性が低下すると考えられる。細胞の増殖性および細胞の移動の実験から、細胞が接着しやすく、局所的にコンフルエントを起こさずに試験片全体に移動することができる S_a は本研究の中では、細胞を培養する上で最も優れた表面処理方法であり、これ以降は表面処理手法として S_a を用いて細胞の培養基材を製作することとする。

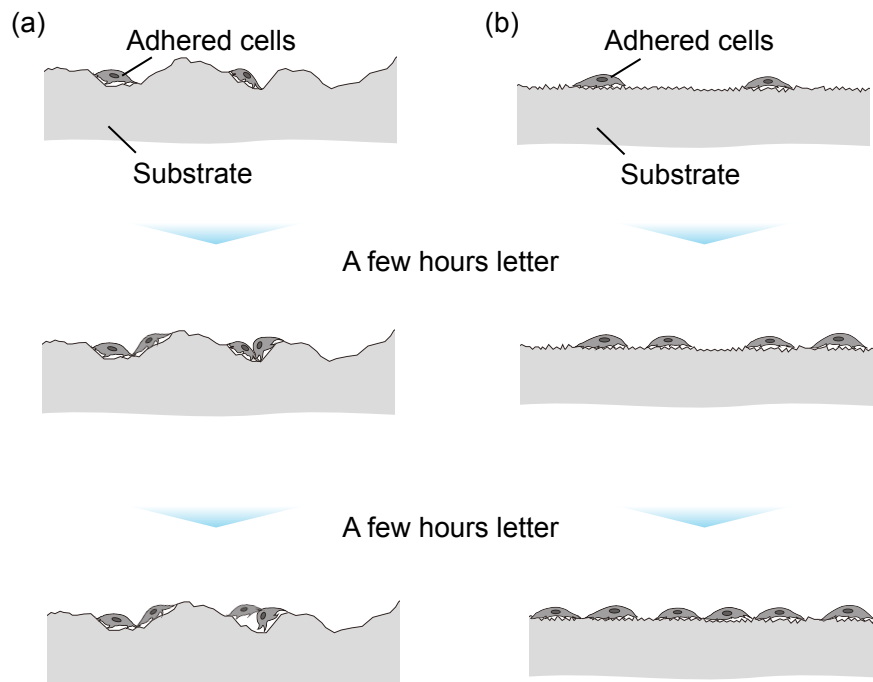


Fig. 2-14 Schematic illustration of cell proliferation sequence to (a) S_s and to (b) S_a after seeding. (a) Cells concentrate locally and proliferation become lower due to contact inhibition. (b) Cells spread to the whole specimen and proliferation is maintained.

2.5 金属製細胞培養器の製作および細胞毒性評価

SUS316L ステンレス鋼 (2.1 節で選定) にアルミナ微粒子を用いた FPP 処理 (2.3 節で選定) を施し, 細胞培養基材を製作し, この培養基材を用いて細胞培養器を製作する.

2.5.1 金属製細胞培養器の製作

Fig. 2-15 に製作した金属製細胞培養器を示す. 本培養器は FPP 処理を施した金属基材, シリコーンゴム壁, 金属蓋, シリコーンゴム蓋から構成されている. 金属基材および金属蓋は, ワイヤ放電加工機 (MGW-JL, 株式会社牧野フライス製作所, 東京, 日本) を用いて

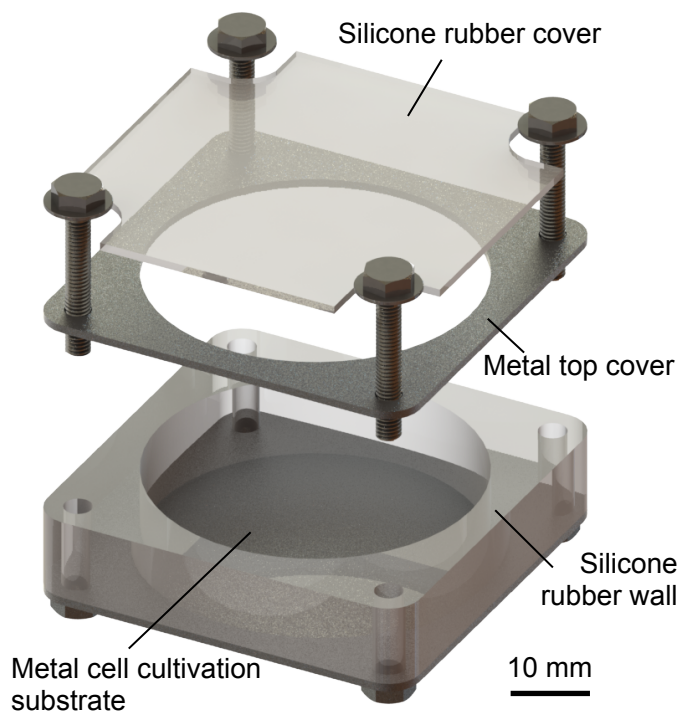


Fig. 2-15 The diagram of cell culture device composed a metal cultivation substrate, a silicone rubber wall, a metal top plate, and a silicone rubber cover.

厚さ 1 mm の SUS316L 鋼の板材を加工して製作した (Fig. 2-16)。また、シリコンゴム部品は、鋳型を製作して成形した。ただし、鋳型は優れた耐熱性と耐薬品性および高い強度と剛性を備えたポリエーテルイミド (PEI) 樹脂 (ジュラトロン PEI, クオドラントポリペンコジャパン株式会社, 東京都, 日本) を材料として, NC ミーリングマシン (MODELA ProII MDX-540, ローランド D. G. 株式会社, 静岡県, 日本) により製作した。製作した鋳型にシリコン溶剤 (KE-1316, 信越化学工業株式会社, 東京都, 日本), 架橋材 (10 % (w/w)) (CAT-1316, 信越化学工業株式会社, 東京都, 日本), シンナー (15 % (w/w)) (RTV-シンナー, 信越化学工業株式会社, 東京都, 日本) を流し込み, 30 分間 150 °C のオーブンで焼成した。製作したシリコンゴム部品を Fig. 2-17 に示す。製作した金属基材, シリコンゴム壁, 金属蓋をステンレス製の六角穴付ボルトとナットで挟み込むことで培養チャンバーを確保した。金属製細胞培養器の培養チャンバーの大きさを一般的な培養ディッシュ (培

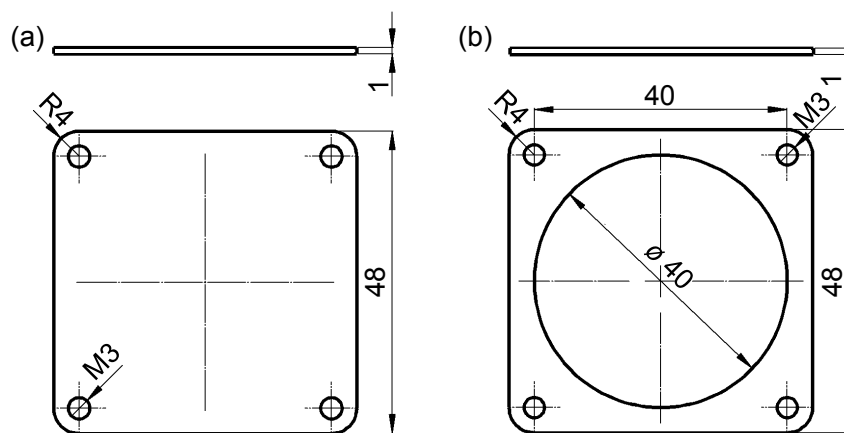


Fig. 2-16 Dimension of (a) the cell cultivation substrate and (b) the metal top cover. All dimensions are in mm.

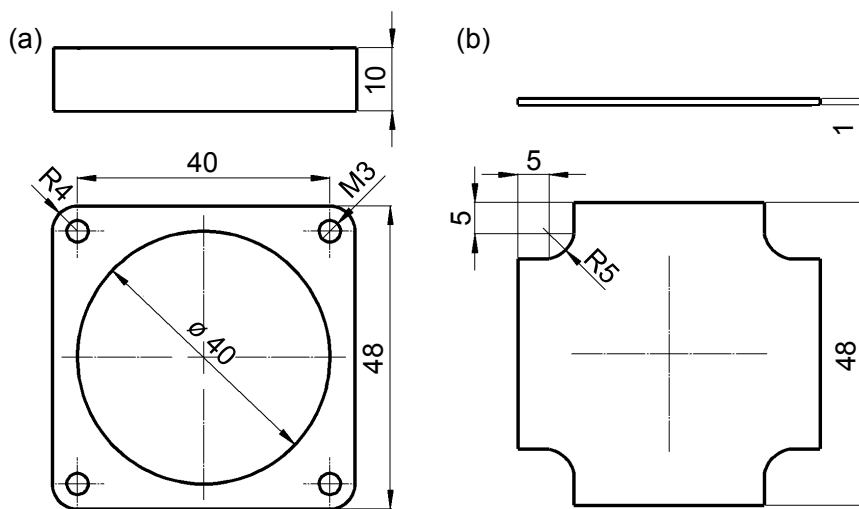


Fig. 2-17 Dimension of (a) the silicone rubber wall and (b) the silicone rubber cover. All dimensions are in mm.

養チャンバー深さ 11 mm, 直径 40 mm) (93040, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) と同様のサイズとするために, 組み立てた培養器の培養チャンバーの直径を 40 mm, 深さを 11 mm とした. ガス透過性のあるシリコンゴムを培養器の蓋とすることで, 培養器内のガス交換が可能である.

2.5.2 金属製細胞培養器の細胞毒性評価の方法

製作した金属製細胞培養器の細胞毒性評価を行うために, 培養した細胞の増殖性を一般的に用いられる培養ディッシュ (93040, Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) と比較して評価した. 金属製細胞培養と培養ディッシュにそれぞれ 1.5×10^5 個の細胞を播種し, 72 時間培養した. その後, トリプシンに 3 分間浸漬した後, ピペッティングで細胞を剥離, 回収して血球計算盤により細胞数を測定した.

2.5.3 金属製細胞培養器の細胞毒性評価の結果

2.5.2 に示す方法で金属製細胞培養器の細胞毒性評価を行った. 金属製細胞培養器と一般的な培養ディッシュの 72 時間後の細胞数を比較した結果を Fig. 2-18 に示す. 同図より, 72 時間経過後の細胞数に有意な差かは認められないことがわかる. このことは, SUS316L 表面に FPP 処理を施すことにより, 市販の高分子基材と同等の培養能力を有することを示している.

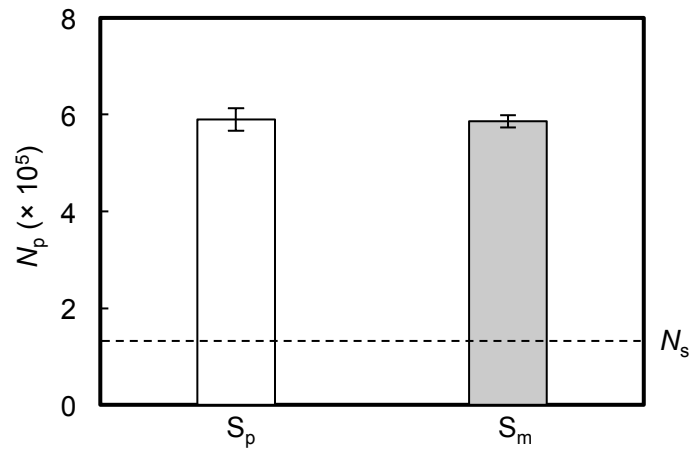


Fig. 2-18 Comparison of number of proliferated cells, N_p , on the conventional cell culture dish with polymer substrate, S_p , and the device with metal substrate, S_m . Cells were cultured for 72 hr (mean \pm SD, $n = 3$). The number of seeded cells is 1.5×10^5 , N_s .

2.6 小括

培養基材の固有振動を細胞に付与するために振動特性に優れた金属材料で金属製細胞培養器を製作した。はじめに、生体適合性に優れた金属材料として SUS316L を選定した。つぎに、細胞活性に優れた培養面を形成するために、微粒子ピーニング (FPP) 処理により表面処理を施した試験片を準備して、細胞の増殖性や仮足の伸展を観察した。その後、この培養面を用いて金属製培養器を製作し、細胞の増殖性を確かめた。この結果、以下の知見を得た。

- FPP 処理により SUS316L 製の培養基材表面に凹凸を形成した。投射粒子にはシリカとアルミナを用いた。シリカ粒子を投射した培養面は比較的なめらかな低周波の凹凸が形成され、アルミナ粒子を投射した培養面は比較的高周波な微視的凹凸が形成された。
- FPP 処理により凹凸を付与した培養面で培養した仔ウシ由来軟骨細胞は、比較のために準備した鏡面上で培養した細胞と比べて、増殖性が有意に向上した。この要因は、凹凸を付与した培養面に接着した細胞は、鏡面上で培養した細胞と比較して仮足を多く伸展したためである。

- FPP 処理の中でもアルミナ粒子を投射して微視的凹凸を形成した場合、細胞の増殖性が最も向上した。この要因は、比較的なめらかな低周波の凹凸が形成されたシリカ粒子を投射した培養面上では細胞が局所的にコンフルエントを起こして増殖が阻害されるのに対して、比較的高周波な微視的凹凸が形成されたアルミナ粒子を投射した培養面では細胞が培養面上を移動して局所的なコンフルエントを防ぐためである。
- 増殖性が最も向上したアルミナ粒子を投射した微視的凹凸を有する培養面を用いて金属製培養器を構成し、細胞を培養した結果、増殖性は通常の細胞培養用のディッシュと同等であることが示された。

3 トリプシンと固有振動による細胞の剥離

本章では、2章で製作した金属製培養器の培養基材を振動子として構成し、トリプシン処理と組み合わせて細胞が剥離できるか否かを確認する。具体的には、培養基材の固有値解析を行い、その結果を参考に培養基材を振動子として構成する。その後、培養基材の振動特性を測定するとともに、トリプシンと固有振動による細胞の剥離の有効性、および剥離、残存した細胞の活性を検討する。

3.1 コンセプト

1.4節で述べたように一般的な細胞の継代では、トリプシンを用いて細胞を剥離して回収する。具体的には、トリプシンに浸漬して数分間インキュベータ内で静置した後、振とうやピペッティングすることで細胞を剥離する。細胞はトリプシンに浸漬させるだけでも、振とうやピペッティングするだけでもほとんど剥離、回収することはできず、トリプシンおよび振とうやピペッティングの両方が必要である。トリプシンの剥離効果に依存すると、細胞が損傷する恐れがあることから、トリプシンの効果を抑えつつ細胞を剥離するために、振とうやピペッティングよりも剥離効果の優れた方法が必要である。

このため本章では、培養基材の固有振動に着目した。具体的には、金属製細胞培養器上で培養された細胞に対して、トリプシンと基材の固有振動を組み合わせることを提案し、その有効性を調べる。すなわち、Fig. 3-1に示すように、細胞が接着した培養基材 (Fig. 3-1a) に異なる濃度のトリプシンを散布して固有振動を励振し、細胞を剥離する (Fig. 3-1b)。この剥離した細胞を回収することとした (Fig. 3-1c)。

3.2 固有振動を励振可能な培養器の設計と製作

3.2.1 培養基材の固有値解析

培養基材に振動を効率的に生じさせるために基材の固有振動を用いることとした。このため、有限要素法による固有値解析を用いて培養基材の固有振動モードを解析した。培養基材の形状は、一般的に用いられている培養ディッシュと同様の大きさの培養チャンバー

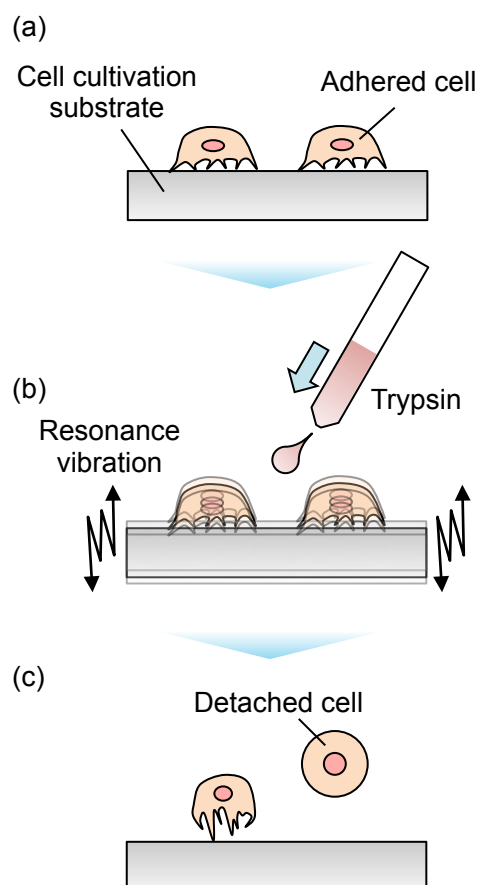


Fig. 3-1 The cell detachment process using trypsin and resonance vibration. (a) Cells adhere to the cell cultivation substrate. (b) Trypsin is spread, and resonance vibration of the cell cultivation substrate is excited. (c) Cells in medium may be collected by pipetting.

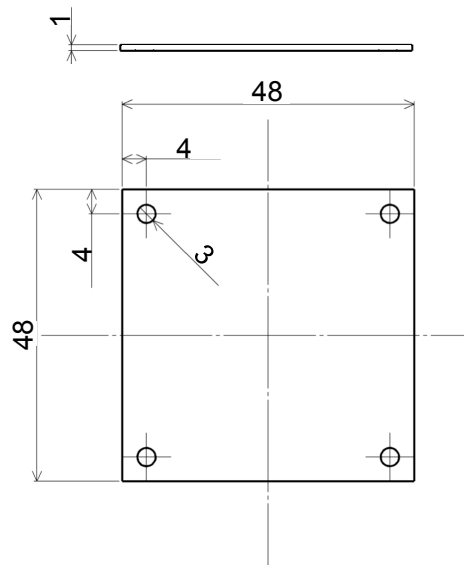


Fig. 3-2 Dimension of the cell cultivation substrate: elevational and plan view. All dimensions are in mm.

Table 3-1 Physical properties used in eigenvalue analysis.

	Stainless steel	Piezoelectric ceramic plate	Adhesion layer
Young's modulus (N/m ²)	19.3×10^{10}	3.56×10^9	2.5×10^9
Poisson's ratio	0.3	0.29	0.4
Density (kg/m ³)	7.98×10^3	7.6×10^3	2.3×10^3

(直径 40 mm) を確保するために、幅 48 mm，奥行 48 mm，厚さ 1 mm とした (Fig. 3-2)。培養基材に励振される面外振動モードを有限要素解析ソフト (ANSYS 15.0, サイバネット株式会社, 東京, 日本) を用いて固有値解析して求めた。解析に用いた物性値を Table 3-1 に示す。固有値解析により得られた固有振動モードの一例を Fig. 3-3 に示す。ただし、境界条件は、基材 4 隅に配置したボルト締結用の穴を固定端とした。同図から、中心を最大振幅とした円状の節を一つ有する面外振動モードおよび中心を節とした十字状の節を一つ有する面外振動モードが存在することがわかる。本研究では比較的低次の振動モードであるこれらの面外振動モードを用いることとした。培養基材に選択的かつ効率的に円状と十字

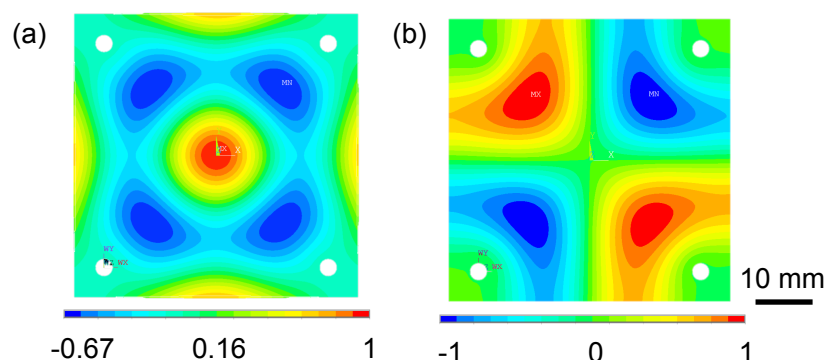


Fig. 3-3 Out-of-plane vibration mode obtained by eigenvalue analysis using ANSYS. The color bars indicate the normalized displacement in the out-off-plane direction by the maximum value. (a) A nodal circle is produced on the substrate at 17.3 kHz, while (b) a nodal cross is produced at 11.5kHz.

状の固有振動モードを励振するために、振動励振に用いる圧電素子の形状および圧電素子表面に配置する電極パターンを適切に決定する必要がある。つまり、励振したい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。このため、Fig. 3-4のように、厚さ方向に分極され、両面に電極を付与した4つの正方形の圧電素子を配置することを考えた。この正方形の圧電素子（15 mm × 15 mm, $t = 0.5$ mm）を培養基材であるSUS316L板の培養面と反対の面に接着し、厚さ方向に周期的な交流電圧を印加すれば所望の固有振動モードが励振される。

この圧電素子の配置の妥当性を検討するために、基材4隅に配置したボルト締結用の穴を固定端とし、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材料の物性値をTable 3.1~3.4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。Fig. 3-4の配置において、各圧電素子の電極に同位相の電圧を印加したパターン1と、電極AとDを同位相に、これに対して電極BとCを逆位相にして電圧を印加したパターン2に対して解析した。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 15.0を用いた。解析結果をFig. 3-5に示す。同図より、パターン1に周波数18.3 kHzの交流電圧を入力すると円状の節を持つ固有振動モードが励振されることがわかる。また、パタ

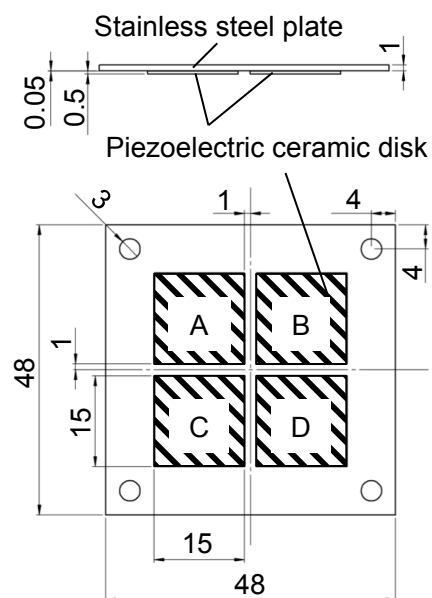


Fig. 3-4 Dimension of the cell cultivation substrate with piezoelectric ceramic squares. The cell cultivation substrate and the piezoelectric ceramic squares are bonded by epoxy adhesive that has a thickness of 0.05 mm. All dimensions are in mm. Four piezoelectric ceramic squares are defined as A, B, C and D, respectively.

Table 3-2 Dielectric matrix of piezoelectric ceramic plate

Dielectric matrix	F/m
ϵ_{11}	3.50×10^{-9}
ϵ_{22}	3.50×10^{-9}
ϵ_{33}	3.56×10^{-9}

3章 トリプシンと固有振動による細胞の剥離

Table 3-3 Piezoelectric matrix of piezoelectric ceramic plate

	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 3-4 Anisotropic elasticity matrix of piezoelectric ceramic plate

	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}

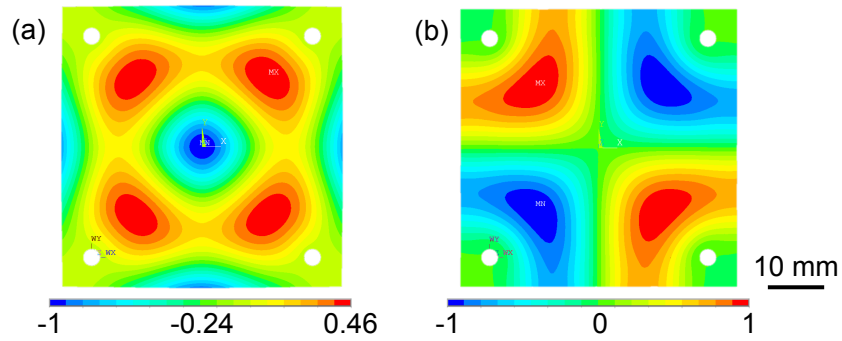


Fig. 3-5 Results of the piezoelectric-structural harmonic analysis using ANSYS. The nodal circle is (a) present in harmonic analysis as driven by the piezoelectric elements at $10 V_{p-p}$ and 18.3 kHz, as is (b) the nodal cross at $10 V_{p-p}$ and 12.0 kHz. In the former case, all elements are driven in phase (pattern 1), while for the latter adjacent elements are driven out of phase with respect of each other (pattern 2). The color bars indicate the normalized displacement in the out-of-plane direction by the maximum value.

ーン 2 に周波数を 12.0 kHz の交流電圧を入力すると十字状の節を持つ固有振動モード励振されることがわかる。Fig. 3-5 の振幅分布は Fig. 3-3 と十分類似していることから、設計した圧電素子の配置によって基材に所望の固有振動モードを励振できるといえる。

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 Fig. 3-4 のように決定した。

3.2.2 培養器の製作

Fig. 3-6 に培養器の構造を示す。本培養器は 3.2.1 で設計した圧電素子を貼り付けた金属製培養基材と 2.5.1 で製作したシリコーンゴム壁、金属蓋、シリコーン蓋から構成されている。なお、培養面は 2.5.1 と同様にアルミナ粒子を用いた微粒子ピーニング (FPP) 処理を施している。圧電素子 (C-213, 富士セラミックス, 静岡, 日本) と培養基材の接着には、2液混合エポキシ系接着剤 (アラルダイト AR-S30, ハンツマン・ジャパン株式会社, 兵庫, 日本) を用い、培養基材と圧電素子を面外方向から加圧して接着した。なお、加圧条件は、圧力を $3 N/m^2$ とし、加圧時間を 12 時間とした。シリコーンゴム壁は培養基材および金属蓋の間に 4 本のネジを用いて挟み込むことによって把持されている。培養基材とシリコーンゴム壁で構成される培養チャンバーの直径は 40 mm であり、培養面から金属蓋までの高さは 11 mm である。

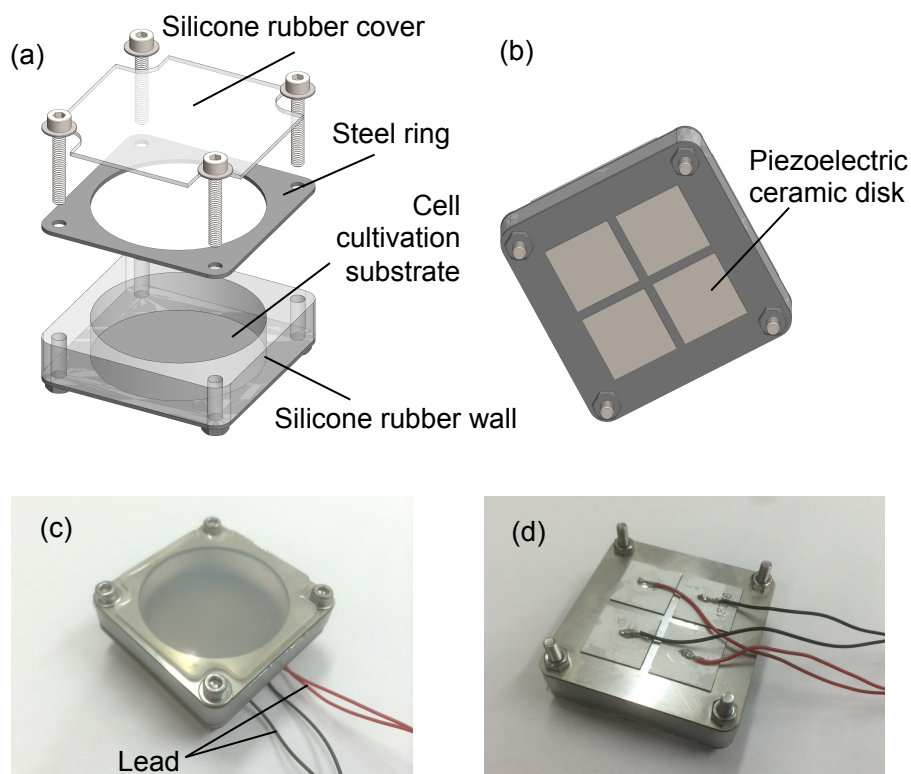


Fig. 3-6 Cell culture device with piezoelectric ceramic plates. (a) Structure of the device, (b) back side of the device, (c) and (d) are actual views of fabricated cell culture device.

3.2.3 培養基材の振動特性

製作した培養基材の振動特性を測定した。なお、固有振動の励振には、Fig. 3-7 に示すように培養器にファンクションジェネレータ (WF-1946B, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川県, 日本) と増幅器 (HSA 4011, エヌエフ回路設計ブロック, 神奈川県, 日本) を用いて振動を励振して、レーザドップラ振動計 (LV-1800, 小野測器, 神奈川県, 日本) とオシロスコープ (Wave Surfer 454, Teledyne LeCroy, 東京都, 日本) を用いて培養基材の振動速度を測定し、その後、振動速度から振幅を計算した。

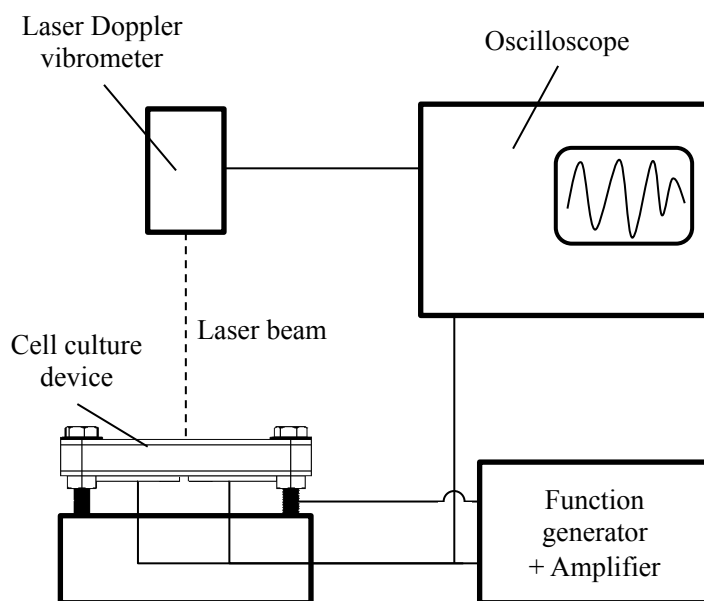


Fig. 3-7 Schematic illustration of experimental setup for characterizing resonance vibration. The vibration of the cell culturing device is measured by the laser Doppler vibrometer.

培養基材に円状、十字状の節を持つ固有振動モードを励振した際の周波数特性を調べた。すなわち、圧電素子の電極に交流電圧を入力し、周波数を変化させながら培養基材上で振幅が最大となる位置での振動振幅を測定した。なお、印加電圧は 50 V とした。Fig. 3-8 にそれぞれ振幅が最大となる位置での振動振幅の測定結果を示す。最大の振幅を示す場所は、円状の節を持つ固有振動モードを励振した際には培養器の中心であり、十字状の節を持つ固有振動モードを励振した際には中心から対角線上に 14 mm の位置である。同図から、円状の節を持つ固有振動モードの固有振動数は 15.9 kHz, 十字状の節を持つ固有振動モードの固有振動数は 13.5 kHz であることがわかる。

つぎに、圧電素子に印加する電圧を一定とし、中心から対角線方向に振動の振幅を測定した。具体的には、入力電圧の周波数を 15.9 および 13.5 kHz とし、Fig. 3-9a, 3-10a にそれぞれ示すように培養基材の中心から矢印方向に 2 mm 間隔で振幅を測定した。Fig. 3-9b, 3-10b に測定結果を示す。なお、印加電圧は培養基材の最大の振幅が 1 μm となるように調節した。Fig. 3-9 より、円状の節を持つ固有振動モードを励振した際には、培養基材の中心が最大振幅となることがわかる。また、中心から 12 mm 以上離れた位置での振動が中心での振動と逆位相であることから、円状の節を 1 つ有する固有振動モードが励振されている

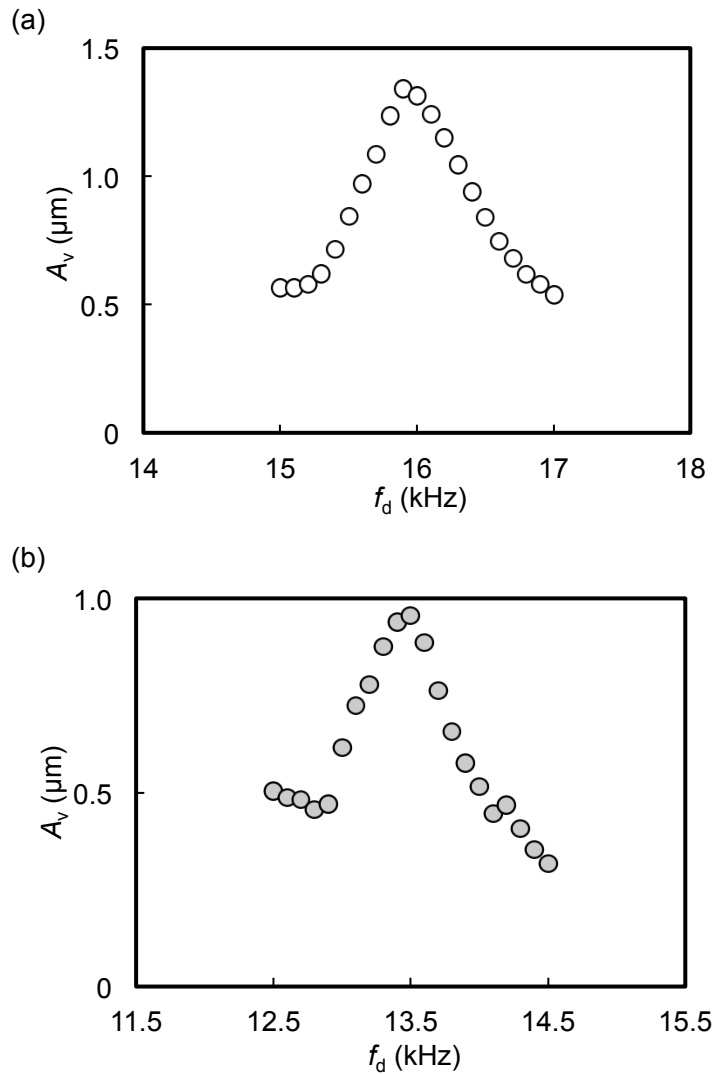


Fig. 3-8 Relationship between the vibration amplitude, A_v , and the driving frequency, f_d , with driving voltage of 50 V_{p-p}. (a) The nodal circle and (b) the nodal cross modes are excited.

ことがわかる。一方，Fig. 3-10 より，十字状の節を持つ固有振動モードを励振した際には，培養基材の中心から対角線上に 14 mm 離れた位置が最大振幅となることがわかる。また，中心から 18 mm の位置まで中心での振動と逆位相となることがなく，測定した振幅の勾配は解析の結果と一致していることから十字状の節を 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。以上のことから製作した培養器には所望の固有振動モードが励振されていることが確認できた。

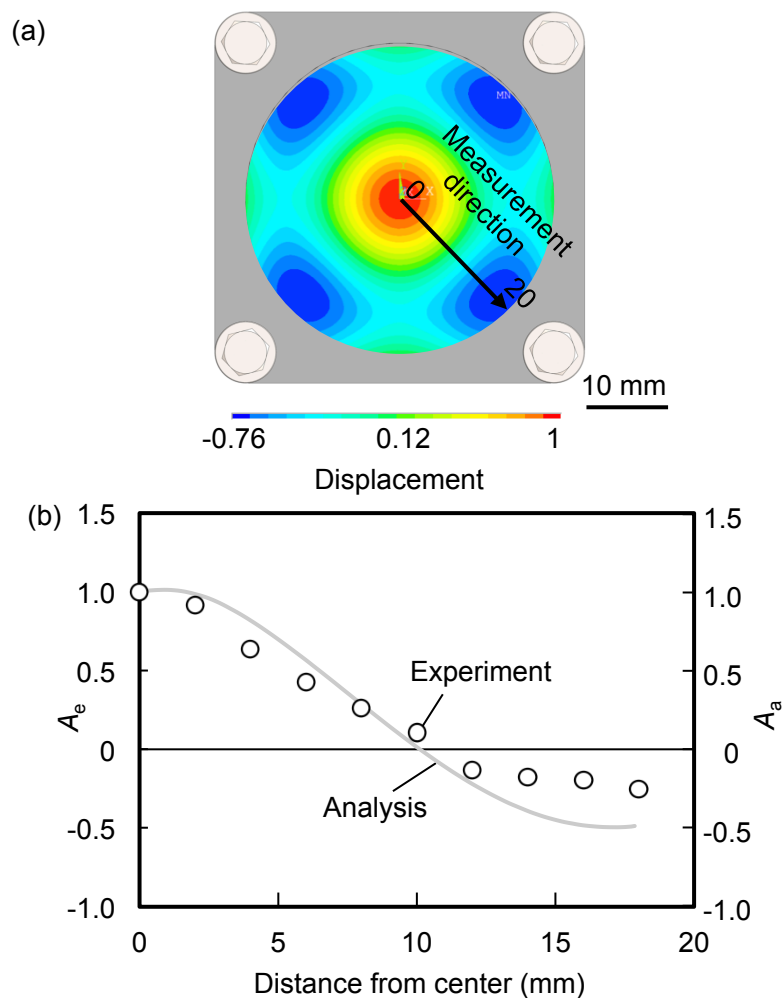


Fig. 3-9 Amplitude distribution. (a) The measurement direction of vibration amplitude. (b) The experimental results normalized by maximum amplitude, A_d , at 18.3 kHz, and the analysis results normalized by maximum amplitude, A_a , are provided at the computed resonance of 15.9 kHz.

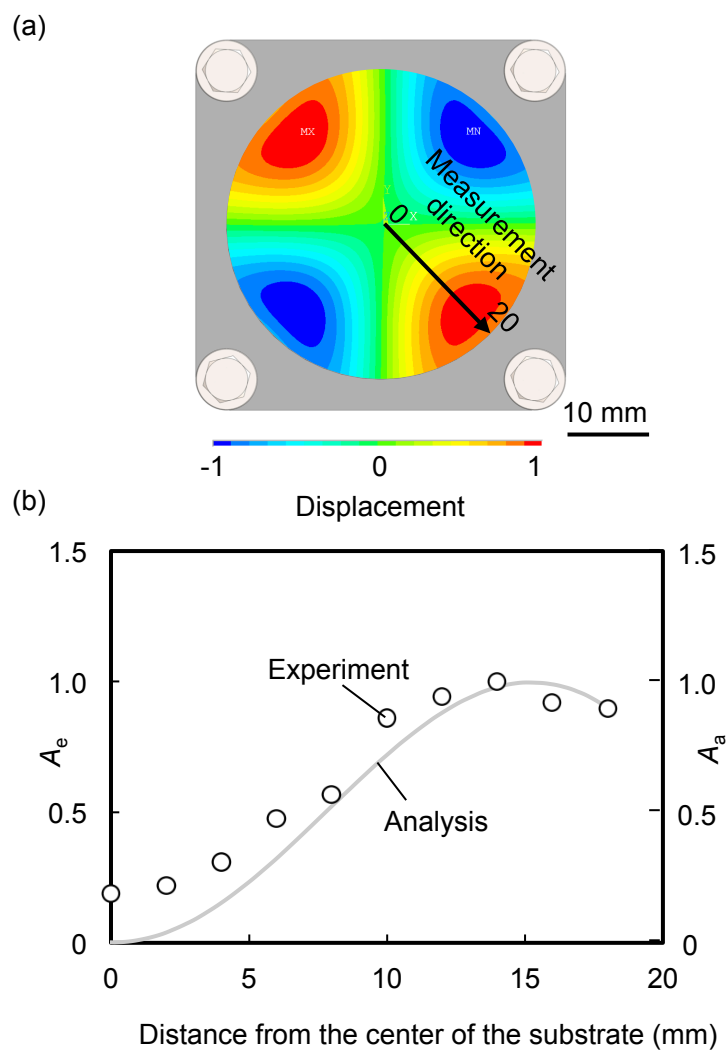


Fig. 3-10 Amplitude distribution. (a) The measurement direction of vibration amplitude. (b) The experimental results, A_e , at 12.0 kHz, and the analysis results normalized maximum amplitude, A_a , are provided at the computed resonance of 13.5 kHz.

3.3 トリプシンと固有振動による細胞剥離実験の方法

本節では、細胞培養実験の準備およびトリプシンと固有振動による細胞剥離方法を用いた際の有効性と回収した細胞の活性や培養基材に残存した細胞の活性を評価する方法について説明する。

3.3.1 培養器の準備

製作した培養器を用いてトリプシンと固有振動による剥離実験を行うためには、培養器を滅菌する必要がある。培養器を組み立てる前に、シリコーンゴム壁、金属蓋、シリコーン蓋をオートクレーブ（121 °C, 2 気圧, 20 分）（LBS-245, TOMY, 東京, 日本）によりあらかじめ滅菌した。一方、培養基材は裏面に圧電素子を 2 液混合エポキシ系接着剤で接着しており、オートクレーブや乾熱滅菌器などの温度変化を利用する滅菌方法では、培養基材と圧電素子の熱膨張率が大きく異なることから、加熱中の培養基材と圧電素子の大きさが異なる膨張率で変化して、培養基材から圧電素子が一部剥がれてしまう。すなわち、温度変化を利用する滅菌処理をした後の培養基材では効率的な固有振動の励振ができない。このため、培養基材をエタノールに浸漬して超音波洗浄し、洗浄後の基材を UV 照射下でよく乾燥させた。その後、過酢酸（アセサイド, サラヤ株式会社, 大阪, 日本）に 15 分間浸漬し、PBS で十分に洗浄することで滅菌した。

3.3.2 細胞の準備

本章でも、前章と同様に仔ウシ由来の軟骨細胞を用いた。仔ウシの膝関節から採取した軟骨組織から軟骨細胞を単離し、一度冷凍保存した後に、解凍して実験に用いるために培養した。3 日に一度、3 回継代し十分に脱分化させた軟骨細胞を用いた。細胞を培養するための培地には FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, MO, US) を 10% 加えたダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物 F-12 ハム (D-MEM/Ham's F-12 with L-glutamine, phenol red, 和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) を用いた。細胞の培養は 75 cm² フラスコを用いて行い、フラスコに接着した細胞を PBS (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) で 2 度洗浄し、トリプシンを散布して 3 分間インキュベータ (37 °C, CO₂ 5%) (CPE-2601, 株式会社ヒラサワ, 東京, 日本) 内で静置したのち、ピペッティングで剥離、回収して、継代を行った。

3章 トリプシンと固有振動による細胞の剥離

軟骨細胞 (1.5×10^5 個) を 3.3.1 で滅菌した培養器に播種し, 24 時間インキュベータ内で培養した. その後, 培養基材に接着している細胞を種々の方法で剥離した.

3.3.3 細胞の剥離方法

細胞の剥離実験には Table 3-5 に示す 5 つの方法を用いた. 以下にその方法を説明する.

1. トリプシン (0.05%) と固有振動 (円状の節) による剥離
0.05%のトリプシン-EDTA (0.05% Trypsin-0.53 mmol/l EDTA・4Na Solution with Phenol Red, 和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) に細胞を浸漬し, 周波数を 15.9 kHz とし て円状の節を 1 つ持つ固有振動を 3 分間励振して剥離した後, 細胞懸濁液を回収した.
2. トリプシン (0.05%) と固有振動 (十字状の節) による剥離
0.05%のトリプシン-EDTA に細胞を浸漬し, 周波数を 13.5 kHz とし て十字状の節を 1 つ持つ固有振動を 3 分間励振して剥離した. その後, 細胞懸濁液を回収した.
3. トリプシン (0.025%) と固有振動 (円状の節) による剥離
0.025%のトリプシン-EDTA に細胞を浸漬し, 周波数を 15.9 kHz とし て円状の節を 1 つ持つ固有振動を 3 分間励振して剥離した. その後, 細胞懸濁液を回収した.
4. トリプシン (0.025%) と固有振動 (十字状の節) による剥離
0.025%のトリプシン-EDTA に細胞を浸漬し, 周波数を 13.5 kHz とし て円状の節を 1 つ持つ固有振動を 3 分間励振して剥離した. その後, 細胞懸濁液を回収した.
5. トリプシン (0.05%) とピペッティングによる剥離 (従来手法)
0.05%のトリプシン-EDTA に細胞を 3 分間浸漬した後, ピペッティングにより剥離, 回収した. なお, ピペッティングによるばらつきを低減するために, ピペッティング時には, 1000 μm ピペッターの先端を培養器の壁面に近づけ, 壁面に懸濁液を伝 わせるようにピペッティングを 10 回行った.

3.3.4 回収および残存した細胞数の測定方法

回収した細胞の数を測定するために, 3.3.3 に示した 5 つの方法で培養面に接着した細胞を剥離した後, 剥離した細胞を培地ごと回収した. 回収した懸濁液にトリパンブルー (Trypan Blue Solution, 0.4%, Thermo Fisher Scientific, MA, US) を 1 : 1 の割合で添加した後, 染色された死細胞を除外して, 生細胞のみを血球計算盤 (A116, アズワン株式会社, 東京,

Table 3-5 Cell detachment experiments with 5 different conditions

	Trypsin concentration (%)	Vibration (μm)	Nodal shape	Pipetting
Trypsin and circle resoance vibration	0.05	0.2, 0.4, 0.6, 0.8	Circle	-
Trypsin and cross resoance vibration	0.05	0.2, 0.4, 0.6, 0.8	Cross	-
Half trypsin and circle resonance vibration	0.025	0.2, 0.4, 0.6, 0.8	Circle	-
Half trypsin and cross resonance vibration	0.025	0.2, 0.4, 0.6, 0.8	Cross	-
Trypsin and pipetting	0.05	-	-	✓

日本) により数えた。

培養面に残存した細胞の数も回収した細胞と同様に測定するために、3.3.3に示した5つの方法で培養面に接着した細胞を剥離した後、剥離した細胞を培地ごと回収した。回収後の培養面を3回PBSで洗浄した後、トリプシン-EDTA (0.05%)を散布し、10分間インキュベータ内に静置した。その後、ピペッティングにより培養基材に残存した細胞を全て剥離、回収した。回収した懸濁液にトリパンブルーを1:1の割合で添加した後、染色された死細胞を除外して、生細胞のみを血球計算盤により数えた。

3.3.5 固有振動を励振した後に培養面に残存した細胞の分布

固有振動を用いて剥離した後に培養面に残存する細胞の分布を検討するために、細胞を蛍光染色した後に固有振動を励振して回収し、培養面を蛍光顕微鏡で観察した。なお、細胞の染色にはカルセイン (C1430, Thermo Fisher Scientific, MA, US)を用いた。カルセインは生細胞を緑色に染色できる蛍光免疫染色の抗体である。染色前に前処理として、通常の培地から無血清培地に置換してインキュベータ内で30分間静置した。その後、細胞をPBS

3章 トリプシンと固有振動による細胞の剥離

により洗浄し、無血清培地に 0.1%の体積濃度で希釈したカルセインを添加し、インキュベータ内で 30 分間静置した。その後、異なる振幅の固有振動を励振した後、細胞をトリプシンに 3 分間浸漬し、ピペッティングにより剥離、回収した。細胞回収後の培養面を蛍光顕微鏡で観察した。観察は中心から対角線方向に 6 mm 間隔で行い、培養基材に接着している細胞数と各位置での振動の振幅を比較した。

3.3.6 回収および残存した細胞の増殖性実験の方法

細胞の活性を調べるために、その指標の 1 つである細胞の増殖性について回収後の細胞を用いて検討した。5 つの方法で回収した細胞を 24 ウェルプレート (92024, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) に 1.5×10^4 個播種し、細胞を 72 時間培養した。その後、トリプシンに 3 分間浸漬し、ピペッティングにより細胞を剥離、回収した。回収した懸濁液にトリパンブルーを 1:1 の割合で添加した後、染色された死細胞を除外して、生細胞を血球計算盤により数えた。

回収した細胞のみでなく、残存した細胞についても細胞の活性を調べるために検討を行った。実験方法を Fig. 3-11 に示す。同図のように、(a) 細胞培養器に 5.0×10^5 個の細胞を播種して、24 時間培養する。その後、(b) トリプシンと固有振動により細胞を剥離、回収し、(e) 一部の培養器の培養面に残存した細胞数を測定する。測定した細胞数の平均値を残存した細胞数として、(c) 比較としてトリプシンとピペッティングにより剥離、回収した細胞を (g) e で測定した数だけ再度培養する。トリプシンと固有振動により剥離した後に残存した細胞およびトリプシンとピペッティングにより回収した細胞を再度播種した細胞を培養した。培養 72 時間後の細胞をトリプシンとピペッティングにより回収し、血球計算盤を用いて細胞数を測定 (f, h) して比較した。

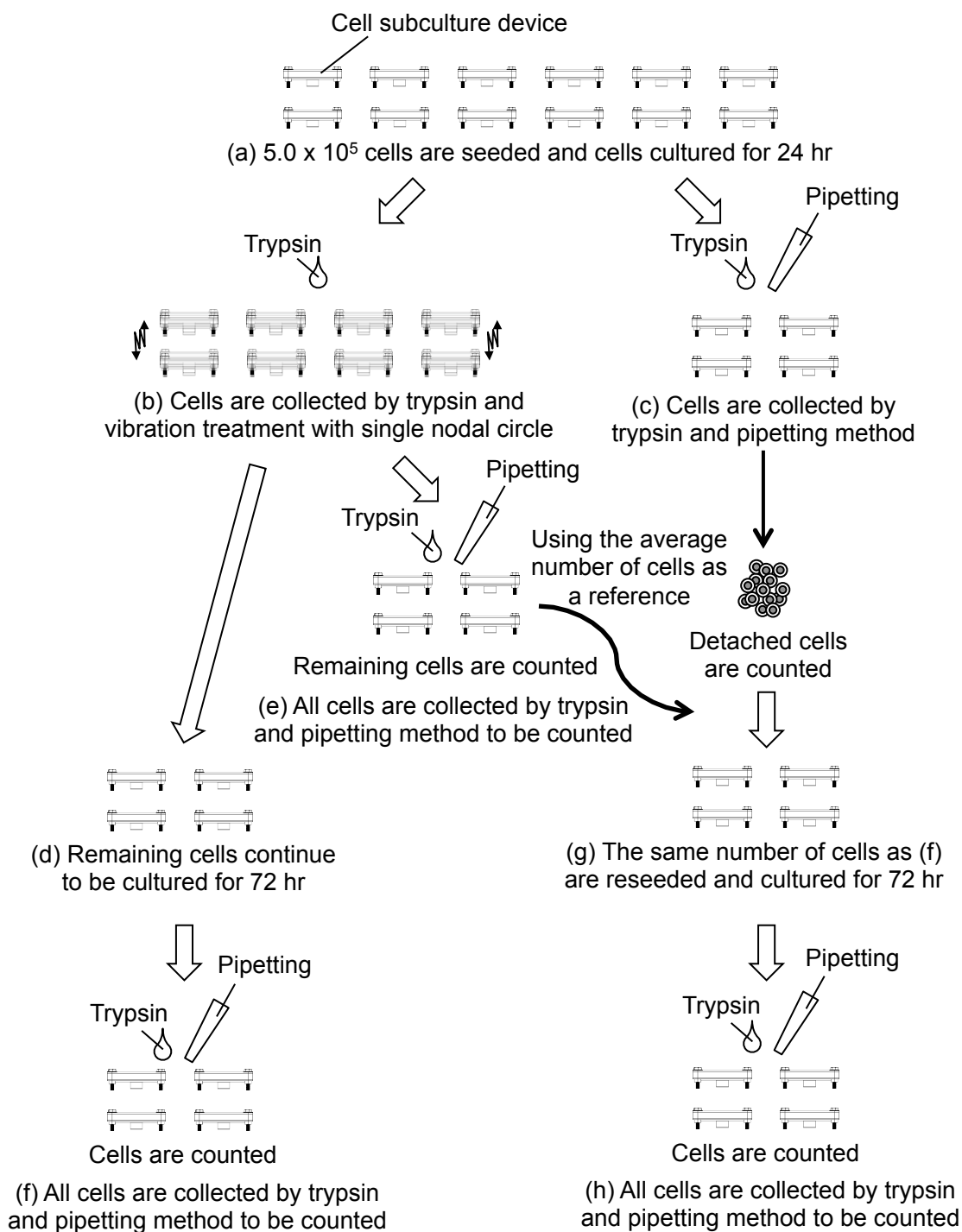


Fig. 3-11 The experimental procedure for comparing the cell proliferation performance between trypsin and resonance vibration with single nodal circle (vibration amplitude of $0.6 \mu\text{m}$) and trypsin and pipetting method. Experimental procedures of trypsin and vibration treatment are (a), (b), (d) and (f), and experimental procedures of controlled trypsin and pipetting treatment are (a), (c), (g) and (h). (e) is just for ensuring the number of remaining cells with trypsin and vibration method.

3.4 トリプシンと固有振動による細胞剥離実験の結果 および考察

3.4.1 回収および残存した細胞数の比較

3.3.3で述べた方法を用いて細胞を剥離した後、3.3.4で述べた方法を用いて剥離および残存した細胞数を測定した。Fig. 3-12に円状の節を持つ固有振動モードを用いて、異なるトリプシン濃度に浸漬し、異なる振動振幅で固有振動を励振した際に回収および残存した細胞数の比較結果を示す。また、Fig. 3-13に十字状の節を持つ固有振動モードを用いて、異なるトリプシン濃度に浸漬し、異なる振動振幅を励振した際に回収および残存した細胞数の比較結果を示す。これらの結果から、励振する固有振動の振幅を増加した際に、回収できる細胞数が向上することがわかる。この結果は、異なる固有振動モード、異なるトリプシン濃度を用いた場合にも同様の傾向を示しており、固有振動の振幅の大きさに依存して剥離、回収できる細胞数が変化することが明らかとなった。

1.3節で説明したように細胞の増殖性の特性から、残存した細胞の増殖性を評価する際には再培養したときに培養面に接着している細胞の密度が重要である。すなわち、回収および残存した細胞の合計数に対して、残存した細胞の割合を調節することが望ましい。なお、通常の培養では接着性細胞を培養する際に、再播種する細胞の割合を合計の12.5% (1/8) 付近[21]となるように継代することが多い。

Fig. 3-12の結果から、トリプシン濃度を0.025%とし、円状の節を持つ固有振動を励振した際には、振幅が0.6 μm のときに残存する細胞数の平均の割合が回収と残存した細胞の合計の14.7%である。また、Fig. 3-13の結果から、トリプシン濃度を0.025%とし、十字状の節を持つ固有振動を励振した際には、振幅が0.4 μm のときに残存する細胞数の平均の割合が回収と残存した細胞の合計の14.6%である。これらの条件は、本実験の中で通常の細胞培養する際に再播種する割合(12.5%)に最も近いことがわかる。

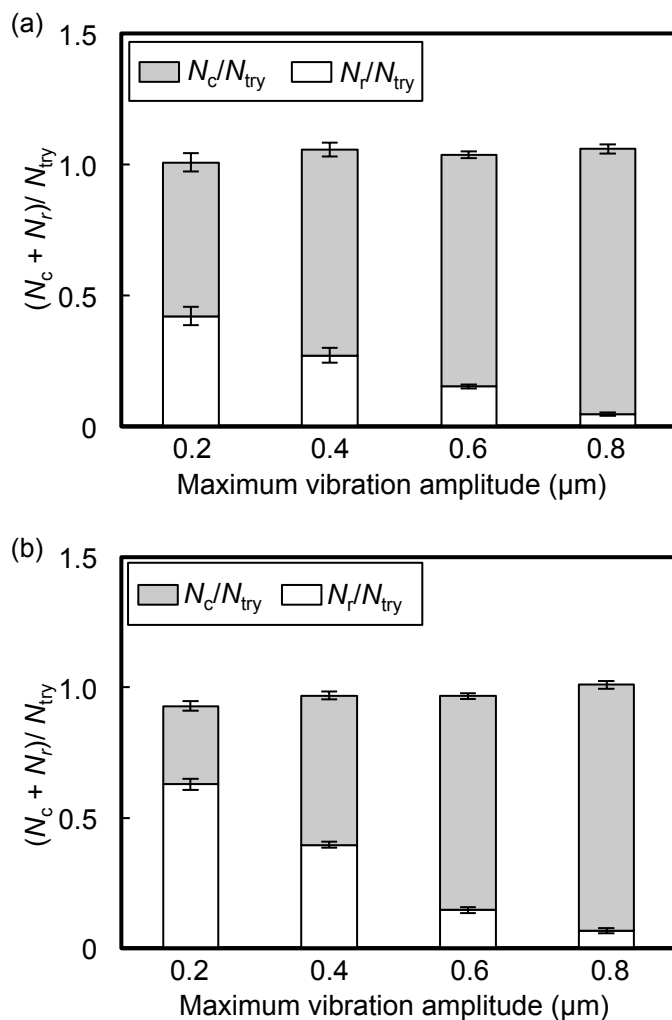


Fig. 3-12 Ratio of the collected or remaining cells to the number of collected cells by trypsin and pipetting method. The number of collected cells, N_c , or remaining cells, N_r , by using trypsin and resonance vibration are normalized by the number of collected cells, N_{try} , by using trypsin and pipetting method. (a) Collected by full-trypsin and circle resonance vibration. (b) Collected by half-trypsin and circle resonance vibration. Cells are seeded to the cell subculture device and cultured for 24hr, and then collected by the nodal circle (mean \pm SD, $n = 4$).

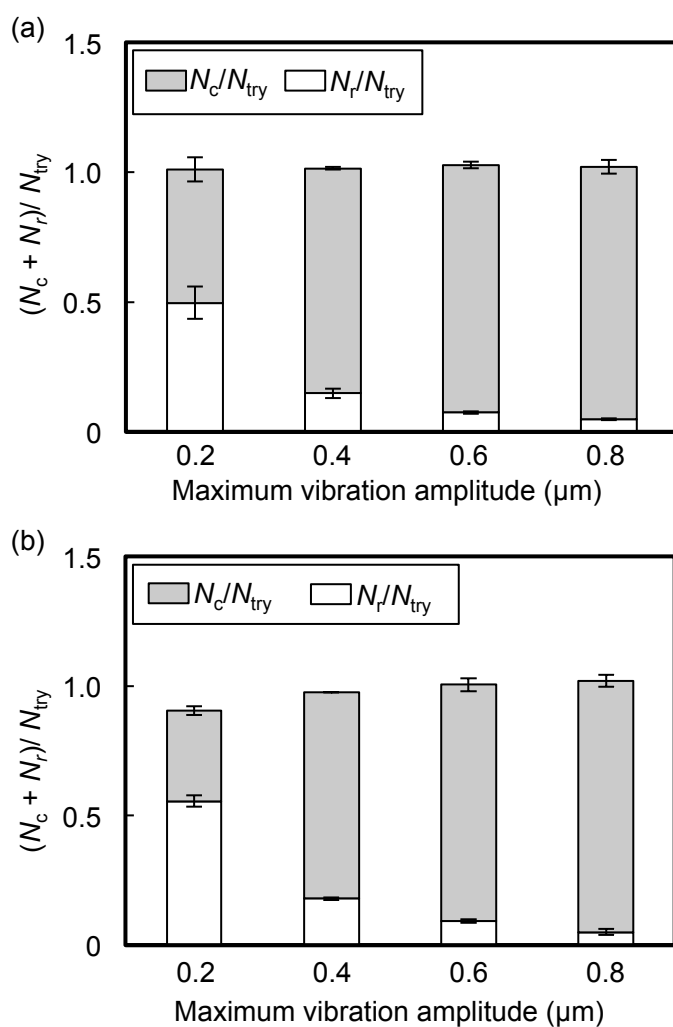


Fig. 3-13 Ratio of the collected or remaining cells to the number of collected cells by trypsin and pipetting. The number of collected cells, N_c , or remaining cells, N_r , by using trypsin and resonance vibration are normalized by the number of collected cells, N_{try} , by using trypsin and pipetting method. (a) Collected by full-trypsin and cross resonance vibration. (b) Collected by half-trypsin and cross resonance vibration. Cells are seeded to the cell subculture device and cultured for 24hr, and then collected by the nodal cross (mean \pm SD, $n = 4$).

3.4.2 固有振動を励振した後に培養面に残存した細胞の分布

3.4.1の結果より、トリプシン濃度を0.025%とした際に、円状の節を持つ固有振動（振幅0.6 μm ）と、十字状の節を持つ固有振動（振幅0.4 μm ）を励振して細胞を剥離した後の培養面を観察することとした。なお、3.3.5に述べた方法を用いて観察し、細胞の分布を調べた。Fig. 3-14に円状の節を持つ固有振動を励振して細胞を回収した後の培養面に残存した細胞の蛍光写真を、Fig. 3-15に十字状の節を持つ固有振動を励振して細胞を回収した後の培養面に残存した細胞の蛍光写真を示す。これらの図から、細胞は培養面上に残存することがわかる。また、Fig. 3-16に細胞分布と振幅分布を示す。同図から、円状の節を持つ固有振動を励振した際には、細胞の残存数と振幅の大きさは反比例の関係にあることがわかる。一方で、十字状の節を持つ固有振動を励振した際には、位置による細胞の残存数の差異は、円状の節を持つ固有振動を励振した場合と比較して小さい。この理由は、理想的には節となる培養面の中心であっても、固有振動を励振した際には振動してしまう（Fig. 3-10）ためであると考えられる。このため、十字状の節を用いた際には、節上に細胞を残存させることが困難であり、細胞の剥離と振動の振幅を比較する実験には適していない。以上のことを鑑み、今後の実験では円状の節を持つ固有振動を用いて細胞の剥離、回収を行うこととした。

3.4.3 回収および残存した細胞の増殖性

3.3.6に示す方法を用いて剥離および回収した細胞の増殖性を調べた。Fig. 3-17a, bに、剥離した細胞を72時間培養した後の細胞数を示す。なお、Fig. 3-17aには、トリプシン(0.05%)と円状の節を持つ固有振動（最大振幅0.6 μm ）により剥離した細胞と従来のトリプシン(0.05%)とピペッティングにより剥離した細胞を比較した結果を示し、Fig. 3-17bに、トリプシン(0.025%)と円状の節を持つ固有振動（最大振幅0.6 μm ）により剥離した細胞と従来のトリプシン(0.05%)とピペッティングにより剥離した細胞を比較した結果を示した。Fig. 3-17aより、従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法とトリプシンと固有振動を用いた剥離方法では、回収後の細胞の増殖性が同様であることがわかる。また、Fig. 3-17bより、低い濃度のトリプシンを用いて細胞を回収した際には、回収後の細胞の増殖性が有意に向上していることがわかる。以上の結果から、固有振動を用いた際にも、回収した細胞の活性は低下しないことが明らかとなった。さらに、低い濃度のトリプシンを用いて剥離、回収した際には、細胞の増殖性が従来のトリプシンとピペッティングによる方法

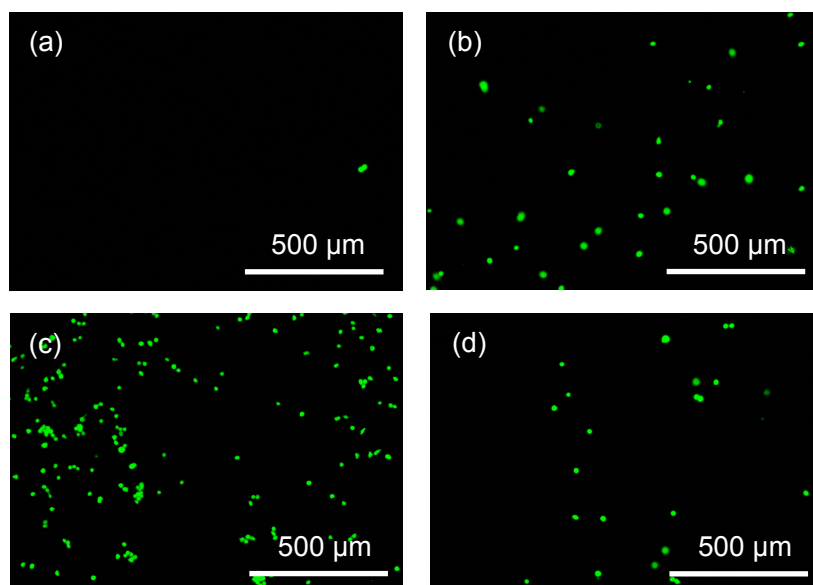


Fig. 3-14 The cell distribution after the half-trypsin and circle resonance vibration. The maximum amplitude of resonance vibration was selected to be $0.6 \mu\text{m}$. They are fluorescent microscopy images of calcein-stained cells. (a) Center of the substrate, (b) 6 mm from center of the substrate, (c) 12 mm from center of the substrate and (d) 18 mm from center of the substrate.

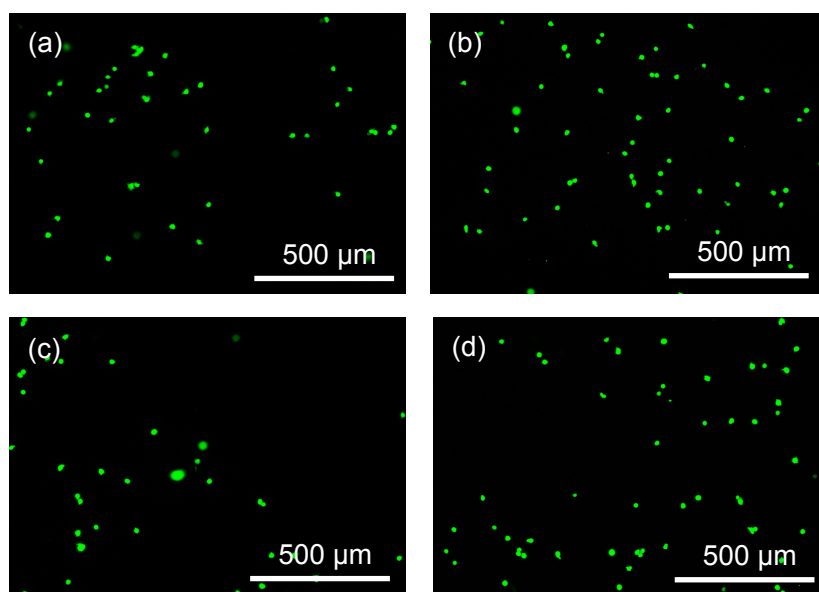


Fig. 3-15 The cell distribution after the half-trypsin and cross resonance vibration. The maximum amplitude of resonance vibration was selected to be $0.4 \mu\text{m}$. They are fluorescent microscopy images of calcein-stained cells. (a) Center of the substrate, (b) 6 mm from center of the substrate, (c) 12 mm from center of the substrate and (d) 18 mm from center of the substrate.

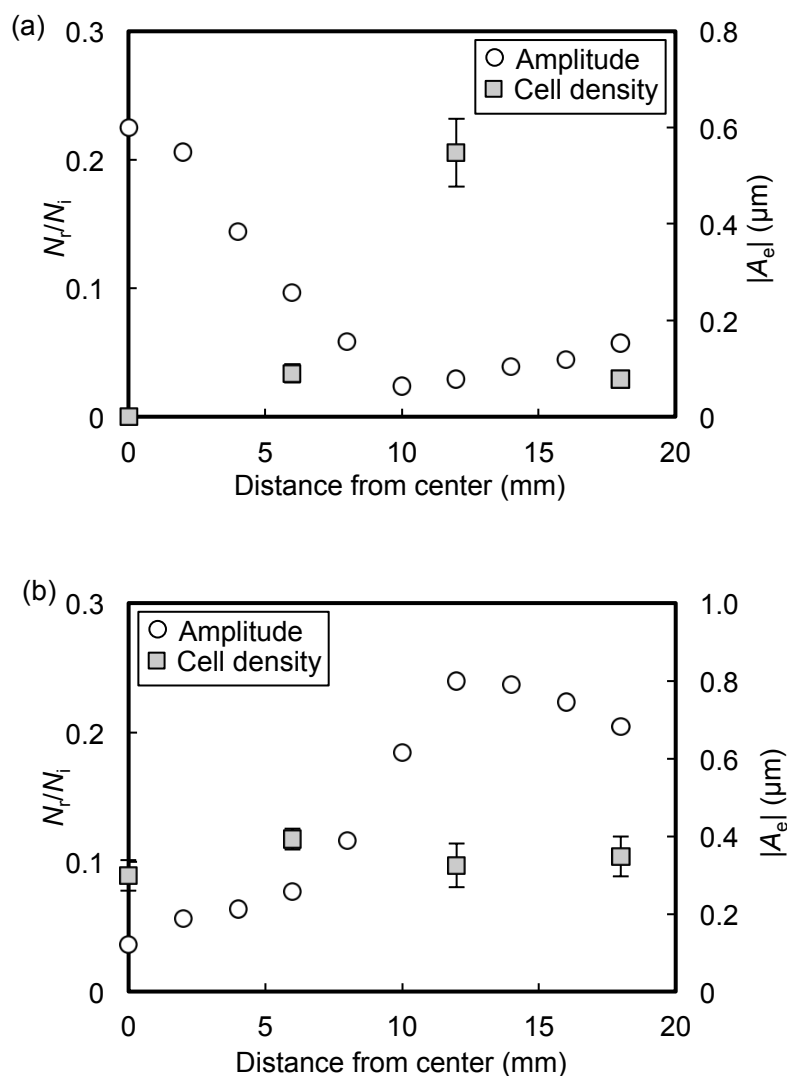


Fig. 3-16 The number of remaining cells, N_r , excited by (a) circle resonance vibration, and (b) cross resonance vibration per initial state, N_i . Absolute value of vibration amplitudes, $|A_e|$, are compared with number of the cells remaining on the cell cultivation substrate after the subculture process (mean \pm SD, $n = 4$).

3章 トリプシンと固有振動による細胞の剥離

で剥離した細胞の増殖性より優れていることがわかる。これは、トリプシンの濃度を薄めることで細胞の損傷を低減したためと考えられる。すなわち、剥離効果の弱い酵素を固有振動と組み合わせることで、トリプシンとピペッティングを用いた従来方法と比較して回収した細胞の活性が向上することが示された。

剥離した細胞のみでなく、残存した細胞についてもその増殖性を評価するため、3.3.6に示す方法を用いて残存した細胞の増殖性を調べた。Fig. 3-18a, bに、トリプシンと固有振動を用いて剥離した後に培養面に残存した細胞を72時間培養した後の細胞数を、従来のトリプシンとピペッティングにより剥離、回収して再度播種して72時間培養した後の細胞数を比較した結果を示す。なお、トリプシンとピペッティングにより剥離、回収して再度播種した細胞数はトリプシンと固有振動を用いて剥離した後に培養面に残存した細胞数と同数に調節した。細胞の剥離には、Fig. 3-18aではトリプシン(0.05%)と円状の節を持つ固有振動(振幅0.6 μm)を用いることとした。また、Fig. 3-18bではトリプシン(0.025%)と円状の節を持つ固有振動(振幅0.6 μm)を用いることとした。さらに、異なる濃度のトリプシンと固有振動により細胞を剥離した後に、培養基材に残存した細胞の増殖性を比較した結果をFig. 3-18cに示す。Fig. 3-18aとFig. 3-18bより、トリプシンと固有振動により剥離した後に培養基材に残存した細胞は従来のトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞と比較して有意に増殖性に優れることがわかる。このことから、固有振動を細胞に励振した際に、培養面に残存する細胞は、従来のトリプシンとピペッティングにより剥離、回収した細胞と比較して高い活性を維持していると考えられる。また、Fig. 3-18cより、トリプシンの濃度を薄めることで、培養基材に残存する細胞の増殖性が向上することがわかる。このことから、効果の弱い酵素を固有振動と組み合わせることで、培養基材に残存する細胞の活性がトリプシンとピペッティングを用いた従来方法と比較して向上することが示された。

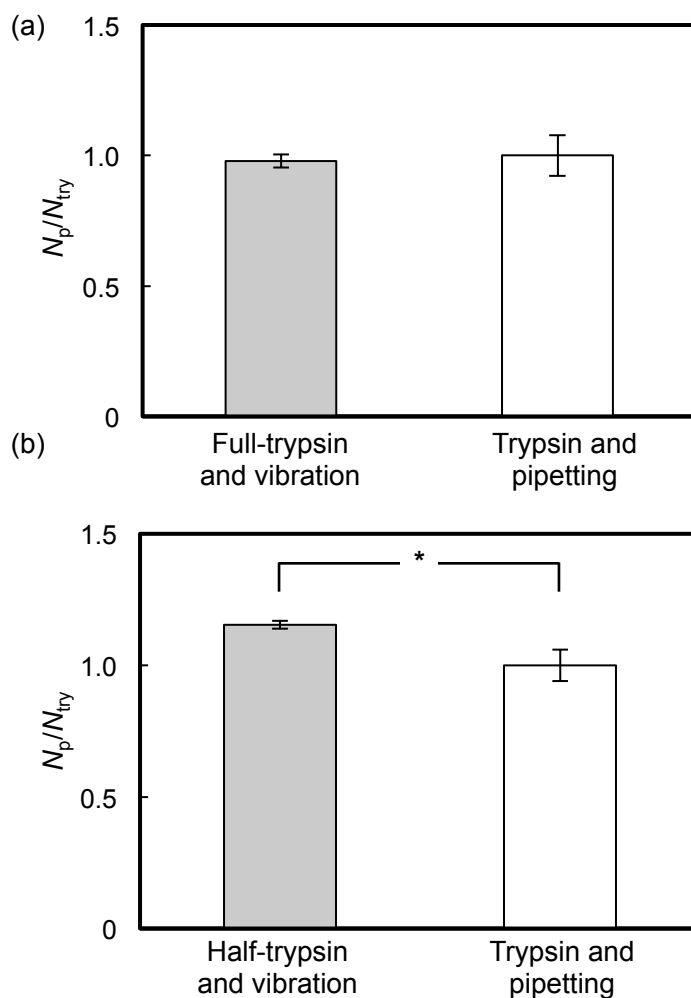


Fig. 3-17 Comparison of number of proliferated cells, N_p , after collection using trypsin and circle resonance vibration. (a) Comparison of number of proliferated cells, N_p , by using full-trypsin and circle resonance vibration method to trypsin and pipetting method. (b) Comparison of number of proliferated cells, N_p , by using half-trypsin and circle resonance vibration method to trypsin and pipetting method. Cells were cultured for 72 hr (mean \pm SD, $n = 4$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). The number of cells is normalized by that with trypsin and pipetting method, N_{try} . The number of cells in the initial state is 1.5×10^4 .

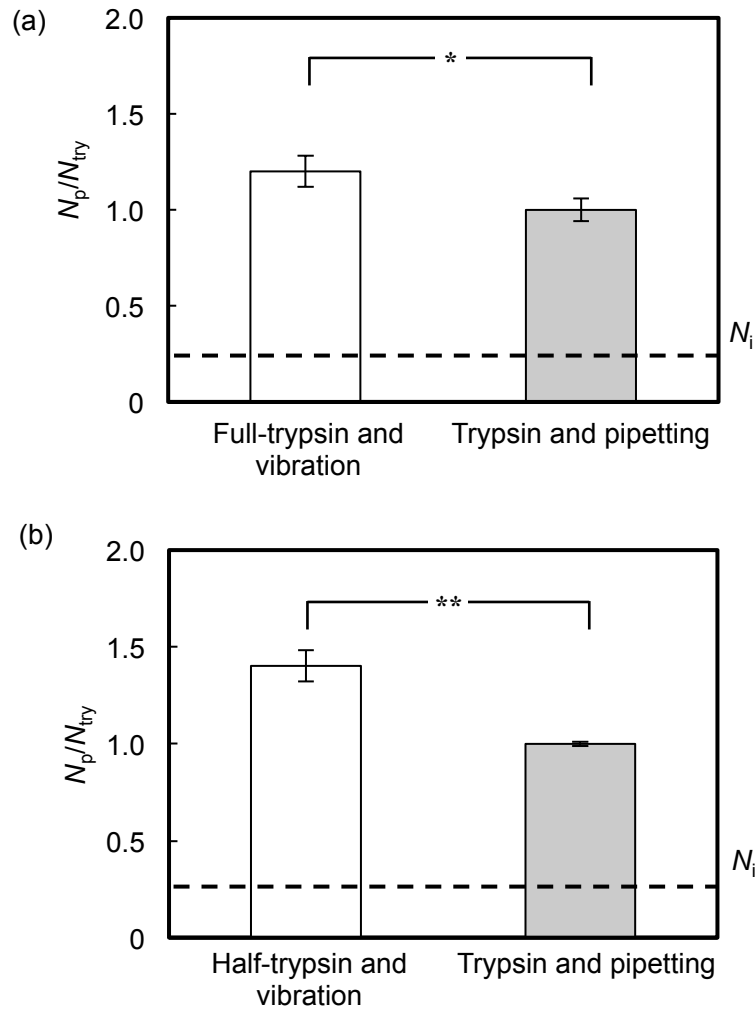


Fig. 3-18 Comparison of number of proliferated cells, N_p . Cells were cultured for 72 hr. The number of cells is normalized by that with each trypsin and pipetting method, N_{try} . (mean \pm SD, $n = 4$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$). (a) Comparison of number of proliferated cells, N_p , by using full-trypsin and circle resonance vibration method to trypsin and pipetting method. The number of cells in the initial state, N_i , is 5.33×10^4 . (b) Comparison of number of proliferated cells, N_p , by using half-trypsin and circle resonance vibration method to trypsin and pipetting method. The number of cells in the initial state, N_i , is 5.75×10^4 .

3.5 小括

細胞が接着した培養面に固有振動を励振するために、培養面の固有振動モードを有限要素法の解析により求めた。その後、金属製培養器の培養面に接着した細胞にトリプシンを散布し、培養面に固有振動を励振して細胞を剥離し、トリプシンと固有振動による細胞剥離の有用性と剥離、残存した細胞の活性を調べた。この結果、以下の知見を得た。

- 固有値解析により培養基材の固有振動モードを求め、培養基材の裏面に正方形の圧電素子を4枚接着して適切な交流電圧を入力すると、円状の節と十字状の節を持つ固有振動モードを選択的に励振できる。
- 振動振幅と残存する細胞数の関係を調べた結果、円状の節を持つ固有振動モードを励振した際には振動振幅と残存する細胞数が反比例することが確認された。一方で、十字状の節を持つ固有振動モードを励振した際には振動振幅と残存する細胞数に相関が認められなかった。この要因として、培養面に振幅が0 μm となる十字状の節を形成することが困難であり、節の部分も微小な振動が発生したためである。
- トリプシンと固有振動により培養面から剥離した細胞、および残存した細胞の増殖性は、トリプシンとピペッティングによる従来の剥離方法で剥離した細胞と同等であることを明らかにした。このことから、固有振動の付与は細胞の活性を低下させずに、細胞を回収できることが確かめられた。
- 培養基材の固有振動を励振する剥離方法において、トリプシンの濃度を薄めることで、剥離、あるいは残存した細胞の増殖性は、従来のトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞と比較して向上することが確認された。これは、使用する酵素のタンパク質分解能力を弱めることで細胞を損傷せずに細胞を剥離することができることを示唆している。

4 コラゲナーゼと固有振動による 細胞の剥離

本章では、3章で製作した金属製培養器を用いて、コラゲナーゼ処理と培養基材の固有振動を組み合わせることで細胞の剥離を試みる。具体的には、金属製培養器で細胞を培養して、コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離の有用性および回収した細胞の様相、回収後の細胞の活性を検討する。

4.1 コンセプト

3章で細胞剥離に用いたトリプシンは、細胞膜を損傷し、細胞の増殖性や活性を低減させる。タンパク質を分解する酵素はトリプシン以外にも様々なものがある。例えば、コラゲナーゼは軟骨細胞を軟骨組織から単離するために用いられる。コラゲナーゼのタンパク質の分解能力は低く、軟骨細胞を軟骨組織から単離するためにはコラゲナーゼに十数時間浸漬する必要がある。一方で、3.4.3の考察から、酵素の剥離効果が弱いほうが従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法と比較して、回収後の細胞の増殖性が向上することが示された。すなわち、トリプシンの代わりにタンパク質の分解能力が低いコラゲナーゼを固有振動と組み合わせることで細胞を剥離、回収することで、酵素による細胞の損傷を低減させつつ、細胞の剥離、回収が可能であると考えられる。このことから Fig. 4-1 に示すように、細胞が接着した培養基材 (Fig. 4-1a) にコラゲナーゼを散布して、培養基材に固有振動を励振して細胞を剥離し (Fig. 4-1b)、剥離した細胞を回収する (Fig. 4-1c) こととする。

4.2 金属製培養器の改良

4.2.1 圧電素子の見直し

本章でも3章と同様に、培養基材の振動を効率的に生じさせるために固有振動を用いることとした。このため、培養基材は3章と同様に幅 48 mm、奥行 48 mm、厚さ 1 mm の形状

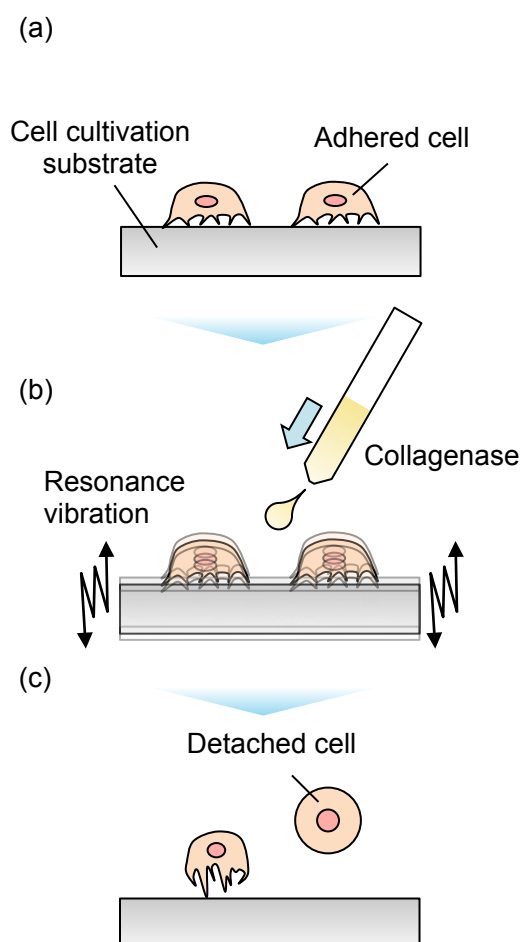


Fig. 4-1 The cell detachment process using collagenase and resonance vibration. (a) Cells adhere to the cell cultivation substrate. (b) Collagenase is spread, and resonance vibration of the cell cultivation substrate is excited. (c) Cells in medium may be collected by pipetting.

の SUS316L 板を用いた。本章では、3 章の培養面に残存した細胞と振動振幅の関係 (Fig. 3-16) の結果と考察から、固有振動を効率的に励振できる円状の節を 1 つ持つ固有振動モードを用いることとした。このため、3 章と異なり円状の節を持つ面外振動モードをより効率的に培養基材に励振するように、圧電素子の形状を変更することとした。3 章で得た固有振動モードの結果 (Fig. 3-3) から、円状の節を 1 つ持つ固有振動モードは、中心を最大振幅として円状の節を持つ面外振動モードであることがわかる。培養基材に選択的かつ効率的に円状の固有振動モードを励振するためには、この固有振動モードを励振するための圧電素子の配置を適切に決定する必要がある。すなわち、円状の節を持つ固有振動モードを励振す

4章 コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離

るために効率のよい圧電素子を選択することとした。このため、厚さ方向に分極され、両面に電極を付与した円板型の圧電素子 ($\phi 40$, $t=0.5$ mm) を配置することを考えた。この円板型の圧電素子を培養面と反対の面の中心に接着し、厚さ方向に周期的な交流電圧を印加すれば所望の固有振動モードが励振される。Fig. 4-2 に示すように圧電素子を接着した培養基材の 3D モデルを作成し、4 隅に配置したボルト締結用の穴を固定端とし、入力電圧を 10 V として圧電-構造連成解析を行った。ただし、3 章と同様に圧電-構造連成解析に Table 3.1 ~3.4 の物性値を用いた。この結果、Fig. 4-3 に示すように周波数 19.1 kHz の交流信号を圧電素子に入力することで、円状の節を持つ固有振動モードが培養基材に励振されることを確認した。

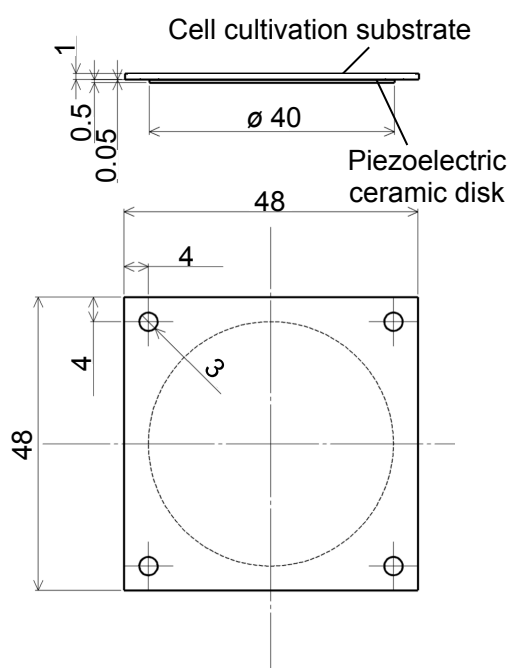


Fig. 4-2 Dimension of the cell cultivation substrate with a piezoelectric ceramic disk. The cell cultivation substrate and the piezoelectric ceramic disk are bonded by epoxy adhesive which have a thickness of 0.05 mm. There are elevational and plan views. All dimensions are in mm.

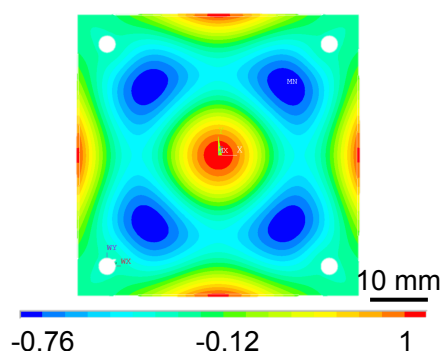


Fig. 4-3 Result of the piezoelectric-structural analysis using ANSYS. The vibration mode shape excited with 19.1 kHz AC input. The color bars indicate the normalized displacement in the out-of-plane direction by the maximum value.

4.2.2 改良した金属製培養器

Fig. 4-4 に培養器の構造を示す。本培養器は 3 章で製作した金属製培養器の振動子を 4.2.1 で選定した円盤型の圧電素子に置き換えた構造である。なお、圧電素子（C-213，富士セラミックス，静岡，日本）と培養基材の接着には、3 章と同様に 2 液混合エポキシ系接着剤（アラライト AR-S30，ハンツマン・ジャパン株式会社，兵庫，日本）を用い、培養基材と圧電素子を面外方向から加圧して接着した。また、培養基材とシリコーンゴム壁で構成される培養チャンバーの直径は 40 mm であり、培養面から金属蓋までの高さは 11 mm である。

4.2.3 培養基材の振動特性

製作した培養基材の振動特性を測定した。3 章と同様に固有振動の励振にはファンクションジェネレータ（WF-1946B，エヌエフ回路設計ブロック，神奈川，日本）と増幅器（HSA 4011，エヌエフ回路設計ブロック，神奈川，日本）を用い、レーザドップラ振動計（LV-1800，小野測器，神奈川，日本）とオシロスコープ（Wave Surfer 454，Teledyne LeCroy，東京，日本）を用いて培養基材の振動速度を測定した。その後、振動速度から振幅を計算した。

はじめに、培養基材に円状の節を持つ固有振動モードを励振した際の周波数特性を明らかにした。すなわち、圧電素子の電極に交流電流を入力し、周波数を変化させながら培養基材の中心での振動の速度を測定した。なお、印加電圧は 10 V とした。Fig. 4-5 に振動速度

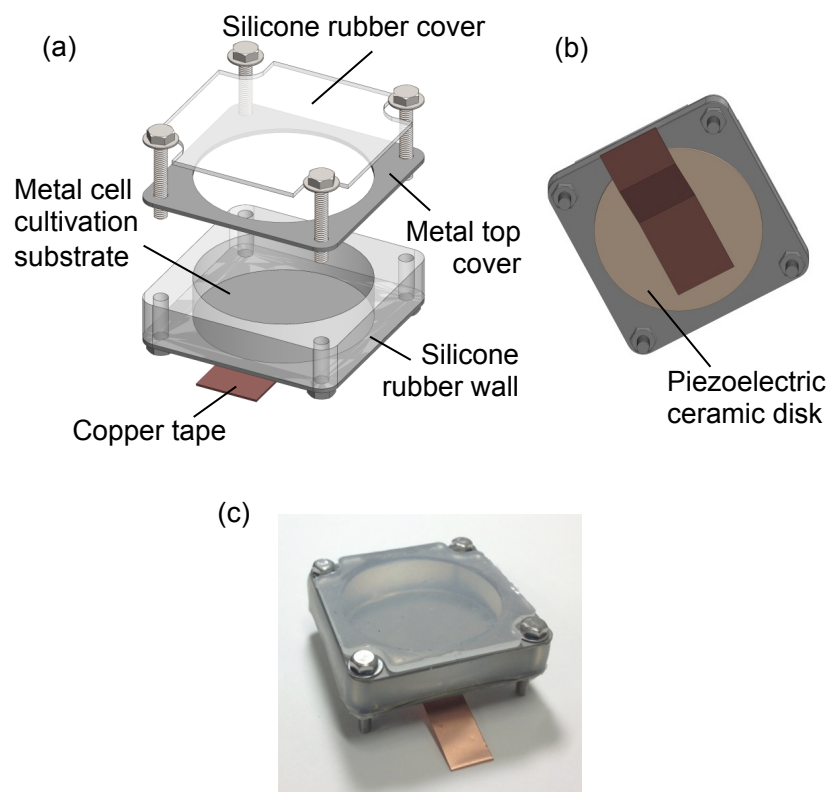


Fig. 4-4 Schematic illustration of a cell culture device with a piezoelectric ceramic disk. (a) Structure of the device, (b) back side of the device and (c) photograph of fabricated cell culture device.

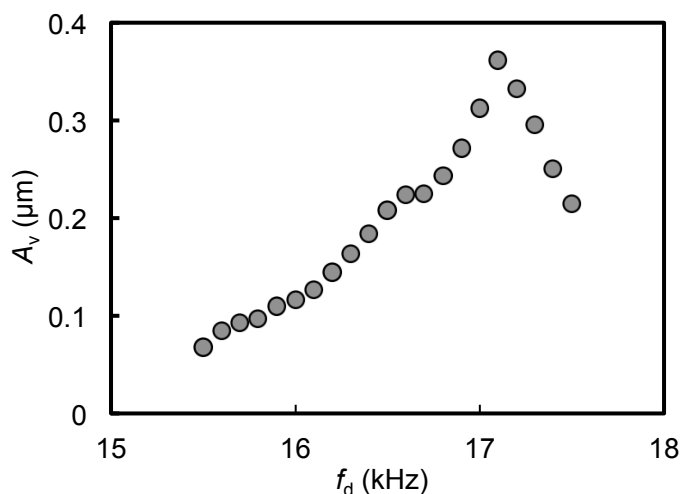


Fig. 4-5 Relationship between the vibration amplitude, A_v , and the driving frequency, f_d , with driving voltage of $10 V_{p-p}$.

から計算した培養基材中心での振動振幅を示す。同図から、励振した固有振動モードの固有振動数は 17.2 kHz であることがわかる。

つぎに、圧電素子に印加する電圧を一定とし、培養基材の振動振幅の分布を測定し、培養基材に励振する振動モードを確認した。具体的には、入力電圧の周波数を 17.2 kHz とし、Fig. 4-6a に示すように培養基材の中心から矢印方向に 2 mm 間隔で振幅を測定した。Fig. 4-6b に測定結果を示す。なお、印加電圧は培養基材の中心の振幅が $1 \mu\text{m}$ となるように調節した。同図より、培養基材の中心が最大振幅となることがわかる。また、中心から 12 mm 以上離れた位置での振動が中心での振動と逆位相であることから、円状の節を持つ固有振動モードが励振されていることがわかる。以上のことから製作した培養器には所望の固有振動モードが励振されていることが確認できた。

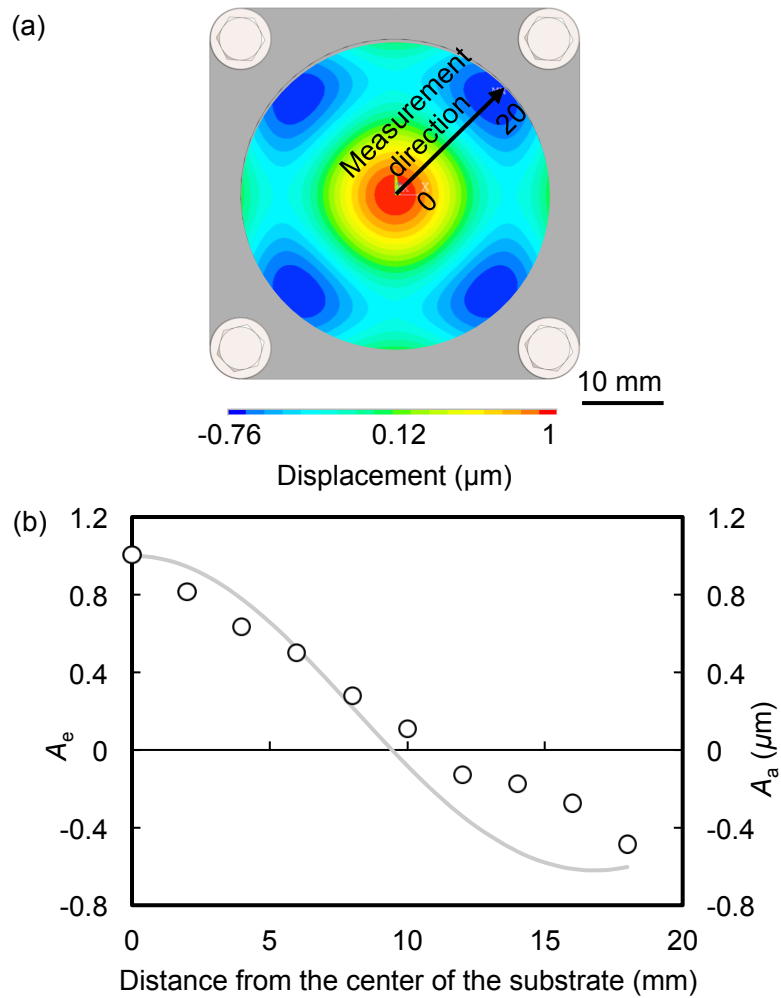


Fig. 4-6 Amplitude distribution. (a) The measurement direction of vibration amplitude. (b) The experimental results, A_e , are at 17.2 kHz; the analysis results, A_a , are provided at the computed resonance of 19.1 kHz.

4.2.4 培養基材の温度変化

固有振動を励振すると、エネルギーの損失により振動している培養基材から熱を発する可能性が懸念される。細胞は周囲の環境の温度に敏感であり、44 °C を越える環境下で培養すると生存することが難しい[112]。このため、固有振動を励振した際の培養面の温度を測定した。なお、培養基材の温度変化の測定はインキュベータ (37 °C, CO₂ 5%) (CPE-2601, 株式会社ヒラサワ, 東京, 日本) の中で行った。培養面の温度の測定には K 型熱電対 (103JT-025, SEMITEC 株式会社, 東京, 日本) を用いて、振動の励振条件を細胞培養実験と同様の周波数 17.2 kHz, 最大振幅 1 μm, 励振時間を 3 分間とした。

Fig. 4-7 に培養面の温度変化を示す。同図より、培養基材に大きな温度変化は認められない。このことから、本実験に用いる振動の励振条件では、細胞の活性に影響を及ぼすだけの発熱はないことが確かめられた。

4.3 コラゲナーゼと固有振動による細胞剥離実験の方法

本節では、細胞培養実験の準備やコラゲナーゼと固有振動を用いて細胞を剥離する方法の有効性、回収した細胞の様相、およびその活性を評価する方法について説明する。

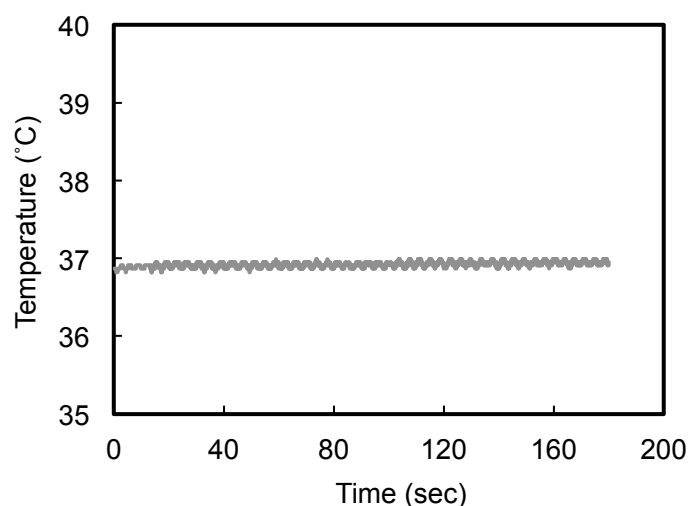


Fig. 4-7 Relationship between the substrate temperature of the cell culture device and time.

4.3.1 培養器の準備

製作した培養器を本章で実施するコラゲナーゼと固有振動による剥離実験に用いるためには、培養器を滅菌する必要がある。滅菌の方法は 3.3.1 と同様であるが、以下に具体的に再掲する。培養器を組み立てる前に、シリコーンゴム壁、金属蓋、シリコーン蓋をオートクレーブ（121 °C, 2 気圧, 20 分）（LBS-245, TOMY, 東京, 日本）によりあらかじめ滅菌した。一方、培養基材はエタノールで超音波洗浄し、UV 照射下でよく乾燥させた。その後、過酢酸（アセサイド, サラヤ株式会社, 大阪, 日本）に 15 分間浸漬し、PBS で十分に洗浄することで滅菌した。

4.3.2 細胞の準備

本章の実験でも、2, 3 章と同様に仔ウシ由来の軟骨細胞を用いた。仔ウシの膝関節から採取した軟骨組織から軟骨細胞を単離し、一度冷凍保存した後に、解凍して実験に用いるために培養した。3 日に一度の継代を 3 回繰り返す、十分に脱分化させた軟骨細胞を用いた。なお、細胞を培養するための培地には FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, MO, US) を 10% 加えたダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物 F-12 ハム (D-MEM/Ham's F-12 with L-glutamine, phenol red, 和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) を用いた。細胞の培養は 75 cm² フラスコを用いて行い、フラスコに接着した細胞を PBS (タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本) で 2 度洗浄し、トリプシンを散布して 3 分間インキュベータ (37 °C, CO₂ 5%) 内で静置したのち、ピペッティングで剥離、回収して、継代を行った。

軟骨細胞 (1.5 × 10⁵ 個) を 4.3.1 で滅菌した培養器に播種し、24 時間インキュベータ内で培養した。その後、培養基材に接着している細胞を種々の方法で剥離した。

4.3.3 細胞の剥離方法

細胞の剥離実験には Table 4-1 に示す 6 つの方法を用いた。以下にそれぞれの方法を詳細に説明する。

1. コラゲナーゼと固有振動による剥離

0.10% のコラゲナーゼ (コラゲナーゼ Type I, Sigma-Aldrich, MO, US) に細胞を浸漬し、固有振動を 3 分間励振して剥離した。その後、細胞懸濁液を回収した。

4章 コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離

2. トリプシンとピペッティングによる剥離

0.05%のトリプシン-EDTA (0.05% Trypsin-0.53 mmol/l EDTA・4Na Solution with Phenol Red, 和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) に細胞を3分間浸漬した後, ピペッティングにより剥離, 回収した.

3. トリプシンと固有振動による剥離

0.05%のトリプシン-EDTA に細胞を浸漬し, 固有振動を3分間励振して剥離した. その後, 細胞懸濁液を回収した.

4. コラゲナーゼとピペッティングによる剥離

0.10%のコラゲナーゼに細胞を3分間浸漬した後, ピペッティングにより剥離, 回収した.

5. コラゲナーゼによる剥離

細胞をコラゲナーゼに3分間浸漬して剥離した後, 細胞懸濁液を回収した.

6. 固有振動による剥離

固有振動を3分間励振して細胞を剥離した後, 細胞懸濁液を回収した.

Table 4-1 Cell detachment experiments with 6 different conditions

	Collagenase concentration (%)	Trypsin concentration (%)	Vibration (μm)	Pipetting
Collagenase and resonance vibration	0.10	-	1.0	-
Trypsin and pipetting	-	0.05	-	✓
Trypsin and resonance vibration	-	0.05	-	-
Collagenase and pipetting	0.10	-	-	✓
Collagenase	0.10	-	-	-
Resonance vibration	-	-	1.0	-

4.3.4 回収した細胞数の測定方法

4.3.3 に示した 6 つの方法で、培養面に接着した細胞を剥離した。その後、剥離した細胞を培地ごと回収した。回収した懸濁液にトリパンプルー (Trypan Blue Solution, 0.4%, Thermo Fisher Scientific, MA, US) を 1 : 1 の割合で添加した後、染色された死細胞を除外して、生細胞のみを血球計算盤 (A116, アズワン株式会社, 東京, 日本) により数えた。

4.3.5 回収した細胞の増殖性実験の方法

細胞の活性を調べるために、回収後の細胞の増殖性を検討した。4.3.3 に示した 1~6 の方法で回収した細胞を 24 ウェルプレート (92024, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) に 1.5×10^4 個播種し、細胞をインキュベータ内で 72 時間培養した。その後、トリプシンに 3 分間浸漬した後にピペッティングにより細胞を回収し、回収した懸濁液にトリパンプルーを 1 : 1 の割合で添加した後、染色された死細胞を除外して、生細胞のみを血球計算盤により数えた。

4.3.6 顕微鏡による観察方法

回収した細胞を評価するために、剥離した細胞を顕微鏡により観察した。

(i) 微分干渉顕微鏡による細胞の観察

コラゲナーゼと固有振動および従来のトリプシンとピペッティングで剥離した細胞の仮足の損傷の違いを調べるために、細胞の大きさを評価した。大きさの測定は、 $\phi 35$ 培養ディッシュ (3000-035, AGC テクノグラス, 東京, 日本) にコラゲナーゼと固有振動、および従来のトリプシンとピペッティングで剥離し、回収した細胞をそれぞれ再度播種して、微分干渉顕微鏡 (ECLIPSE TS100, 株式会社ニコン, 東京, 日本) で観察した細胞の最大面積を比較した。すなわち、微分干渉顕微鏡で撮影した細胞の写真から Image J (National Institutes of Health, MD, US) を用いて細胞の最大面積を測定し、コラゲナーゼと固有振動、およびトリプシンとピペッティングにより剥離、回収した細胞の大きさを定量的に比較した。

4章 コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離

(ii) 蛍光顕微鏡による細胞のビンキュリンの観察

細胞を 4.3.3 に示す方法で剥離した後に、培養面に細胞が残存するかいなか調べるために、蛍光顕微鏡によりビンキュリンを観察した。はじめに、観察するための細胞試料を準備した。観察する細胞を固定するために 2.3.4 と同様に、培養基材に接着した細胞を 2.5%グルタルアルデヒド水溶液に 20 分間浸漬し、細胞を完全に固定した後に界面活性剤 Triton X-100 (Sigma-Aldrich, MO, US) に 15 分間浸漬した。その後、PBS に 1.0% ウシ血清由来アルブミン溶液 (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) と 0.1% Tween 20 (Sigma-Aldrich, MO, US), 0.02% アジ化ナトリウム (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) を添加して生成した BSA-PBST に 30 分間浸漬した。なお、ここまでの行程は細胞に蛍光染色液を浸透させるための下準備である。下準備を行った細胞試料を抗ビンキュリン抗体溶液 (42H89L44, Thermo Fisher Science, MA, US) に 1 時間浸漬してビンキュリンを染色し、BSA-PBST を用いて十分洗浄した。なお、観察中も培養面を乾燥させないように BSA-PBST に浸した。

(iii) 走査型電子顕微鏡による細胞表面の観察

細胞の大きさや接着タンパク質だけでなく、剥離した細胞の様相を詳細に調べるために、細胞表面の様子を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。コラゲナーゼと固有振動、および従来のトリプシンとピペッティングで剥離し、回収した細胞を $\phi 35$ 培養ディッシュに播種して、3 分間および 2 時間インキュベータ内で培養した細胞を用意した。なお、3 分間インキュベータ内に静置した細胞では接着直後の細胞の仮足の様子を、2 時間静置したものは接着して十分に伸展した細胞の仮足の様子を比較するために準備した。2.3.4 に示した方法と同様に、2.5%グルタルアルデヒド水溶液 (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) に 20 分間浸漬することで固定した後に、エタノール水溶液 (20, 50, 80%) に 15 分ずつ浸漬して徐々に脱水した。100%エタノールで洗浄した後、100%エタノールに 30 分間浸漬して、完全に脱水した。その後、*t*-ブチルアルコール (東京化成工業株式会社, 東京, 日本) に 15 分間浸漬したのち、新しい *t*-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した。凍結乾燥した試料を *t*-BuOH 凍結乾燥機 (VFD-21S, 株式会社真空デバイス, 茨城, 日本) により昇華させて細胞を乾燥させた。その後、オスミウムコーター (HPC-1S, 株式会社真空デバイス, 茨城, 日本) により細胞試料をオスミウムコーティングして、SEM で観察した。なお、加速電圧は 2.0 kV に設定した。

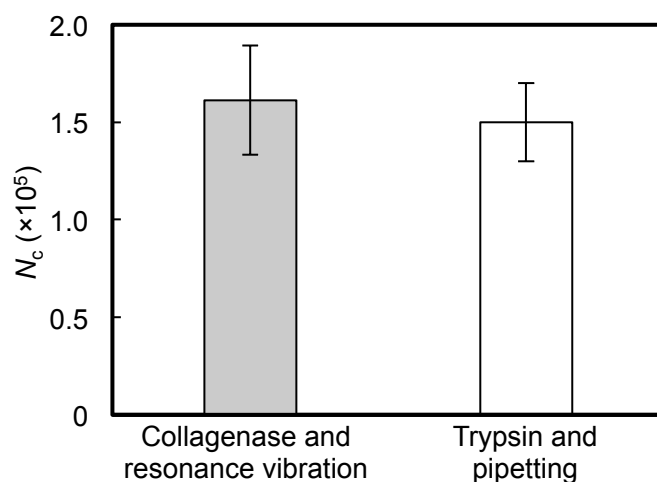


Fig. 4-8 Comparison of number of collected cells, N_c . Chondrocytes were seeded into the cell culture device and cultured for 24 hr. Cells were then collected by either collagenase and resonance vibration, and trypsin and pipetting method (mean \pm SD, $n = 8$).

4.4 コラゲナーゼと固有振動による細胞剥離実験の結果および考察

4.4.1 コラゲナーゼと固有振動による剥離方法の有効性

4.3.4で述べた方法を用いて、コラゲナーゼと固有振動、およびトリプシンとピペッティングにより剥離し、回収した細胞数を調べた。Fig. 4-8に回収した細胞数を示す。同図より、コラゲナーゼと固有振動による剥離方法では、従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法と同等の細胞数を回収できることがわかる。また、Fig. 4-9に回収した後の培養面に接着している細胞のビンキュリンを4.3.6で述べた蛍光顕微鏡により観察した結果を示す。なお、比較として回収前の観察結果も示す。同図より、回収前に細胞が接着している状態の培養面上のビンキュリン(Fig. 4-9c)と比較して、コラゲナーゼと固有振動(Fig. 4-9a)、およびトリプシンとピペッティング(Fig. 4-9b)ともにほとんどビンキュリンが発現していないことがわかる。とくに、コラゲナーゼと固有振動による剥離方法を用いて細胞を回収した培養面ではビンキュリンによる発光が全く認められない。以上のことから、コラゲナーゼと固有振動による剥離方法は、従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法と

同等の細胞の剥離能力があるといえる。

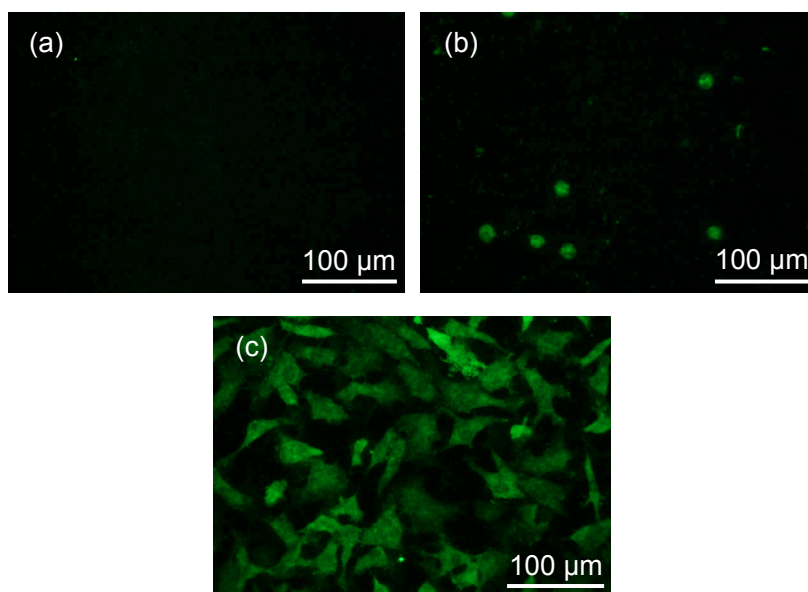


Fig. 4-9 Vinculin fluorescent microscope images of chondrocytes on substrate after detaching cells by each method. (a) Collagenase and resonance vibration method, (b) trypsin and pipetting method. (c) Reference: before collecting process.

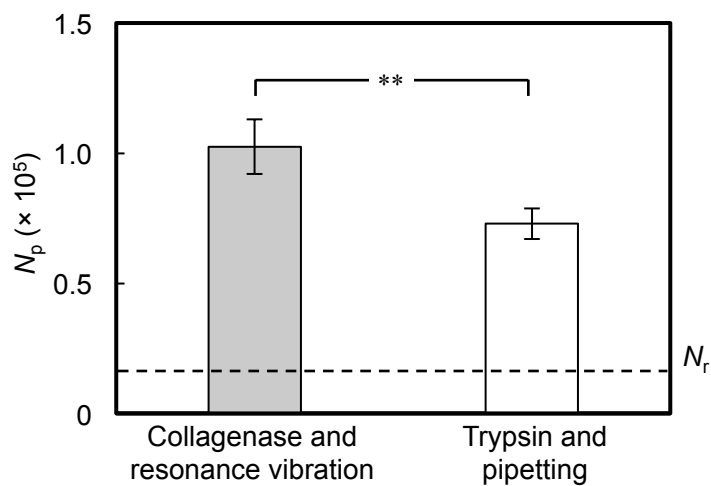


Fig. 4-10 Comparison of the number of proliferated cells, N_p . Cells were cultured for 72 hr after collection using collagenase and resonance vibration method, and trypsin and pipetting method. The number of reseeded cells, N_r , is 1.5×10^4 (mean \pm SD, $n = 8$, **: $p < 0.01$).

4 章 コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離

4.3.5 で述べた方法を用いて、コラゲナーゼと固有振動およびトリプシンとピペッティングにより剥離し、回収した細胞の増殖性を比較した。Fig. 4-10 に剥離した細胞を 24 ウェルプレート上で 72 時間培養した後の細胞数を示す。同図より、コラゲナーゼと固有振動により剥離、回収した細胞の 72 時間培養後の細胞数は、トリプシンとピペッティングにより剥離、回収した細胞数と比較して有意に増加 (1.4 倍) した。このことから、コラゲナーゼと固有振動により剥離した細胞の増殖性は、トリプシンとピペッティングにより剥離した細胞と比較して向上したことが確かめられた。

4.4.2 回収した細胞の様相

4.3.6 で述べた方法を用いて、回収した細胞を微分干渉顕微鏡で観察した。Fig. 4-11a, b にコラゲナーゼと固有振動、およびトリプシンとピペッティングにより剥離、回収した細胞

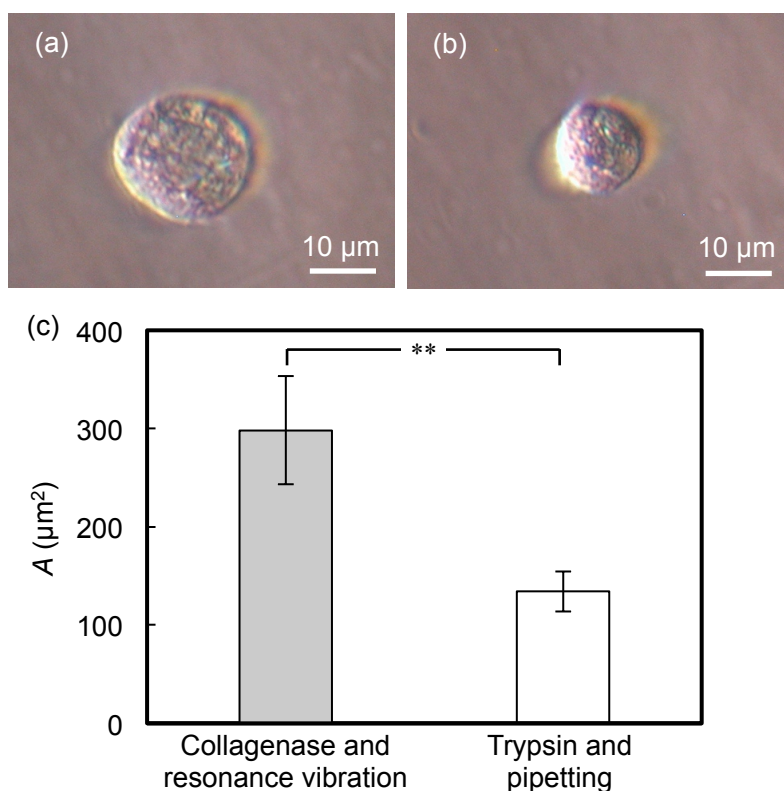


Fig. 4-11 Modulation contrast microscope images of chondrocyte collected using (a) collagenase and resonance vibration method, and (b) trypsin and pipetting method. (c) Comparison of the maximum area of cells collected, A (mean \pm SD, $n = 15$, **: $p < 0.01$).

4章 コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離

胞を微分干渉顕微鏡で観察した様相を示す。また、Fig. 4-11c に回収した細胞の最大面積の平均値を示す。これらの結果から、コラゲナーゼと固有振動により剥離した細胞は、従来のトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞と比較して大きいことがわかる。コラゲナーゼと固有振動により回収した細胞の大きさがトリプシンとピペッティングにより回収した細胞と比較して大きい要因として、細胞膜を構成するタンパク質の分解の有無が挙げられる。細胞剥離酵素としてトリプシンを用いて剥離した場合には、トリプシンのタンパク質分解能力により細胞膜のタンパク質が分解される。一方で、酵素にコラゲナーゼを用いて剥離した場合には、コラゲナーゼが主に細胞外マトリックスを分解し、細胞膜を構成するタンパク質がほとんど分解されない可能性がある。このため、酵素にコラゲナーゼを用いて剥離した細胞の大きさがトリプシンを用いて剥離した細胞と比較して大きくなったと考えられる。

4.3.6 で述べた方法を用いて、回収した細胞を SEM で観察した。Fig. 4-12 にコラゲナーゼと固有振動およびトリプシンとピペッティングにより回収した細胞を培養ディッシュに播種して、インキュベータ内で3分間 (Fig. 4-12a-d) および2時間 (Fig. 4-12e-h) 培養し、培養面に接着した細胞を SEM により観察した結果を示す。Fig. 4-12a-d から、トリプシンとピペッティングにより回収した細胞の表面がなめらかな状態であるのに対して、コラゲナーゼと固有振動により回収した細胞の表面は粗いことがわかる。トリプシンにより回収した細胞の表面と比べて細胞膜のタンパク質が酵素により分解されずに残存した際には、粗い表面となること[113]が報告されている。このことから、コラゲナーゼと固有振動により回収した細胞では細胞膜を構成するタンパク質が残存したといえる。また、Fig. 4-12e-h から、トリプシンとピペッティングにより回収した細胞と比較して、コラゲナーゼと固有振動により回収した細胞の仮足表面や先端に突起が多く確認できる。このことから、コラゲナーゼと固有振動により回収した細胞の仮足の伸展速度はトリプシンとピペッティングにより回収した細胞の仮足の伸展速度と比較して早いことがわかる。

以上の結果から、コラゲナーゼと固有振動による剥離方法はトリプシンとピペッティングによる剥離方法と同等の細胞剥離能力を有しており、回収した細胞の活性が低下せず、向上することが示された。これらの結果から、コラゲナーゼと固有振動により剥離、回収した際には、Fig. 4-13a-c に模式的に示すように、コラゲナーゼが細胞の接着しているタンパク質を分解し、細胞膜を構成するタンパク質を損傷せずに剥離することで細胞の表面が粗い状態で回収される。一方で、トリプシンとピペッティングにより剥離、回収した際には、Fig. 4-13d-f に模式的に示すように、トリプシンが細胞の接着している細胞外マトリックスおよび細胞膜を構成するタンパク質を分解するために、細胞の表面がなめらかな状態で回収されることが考えられる。

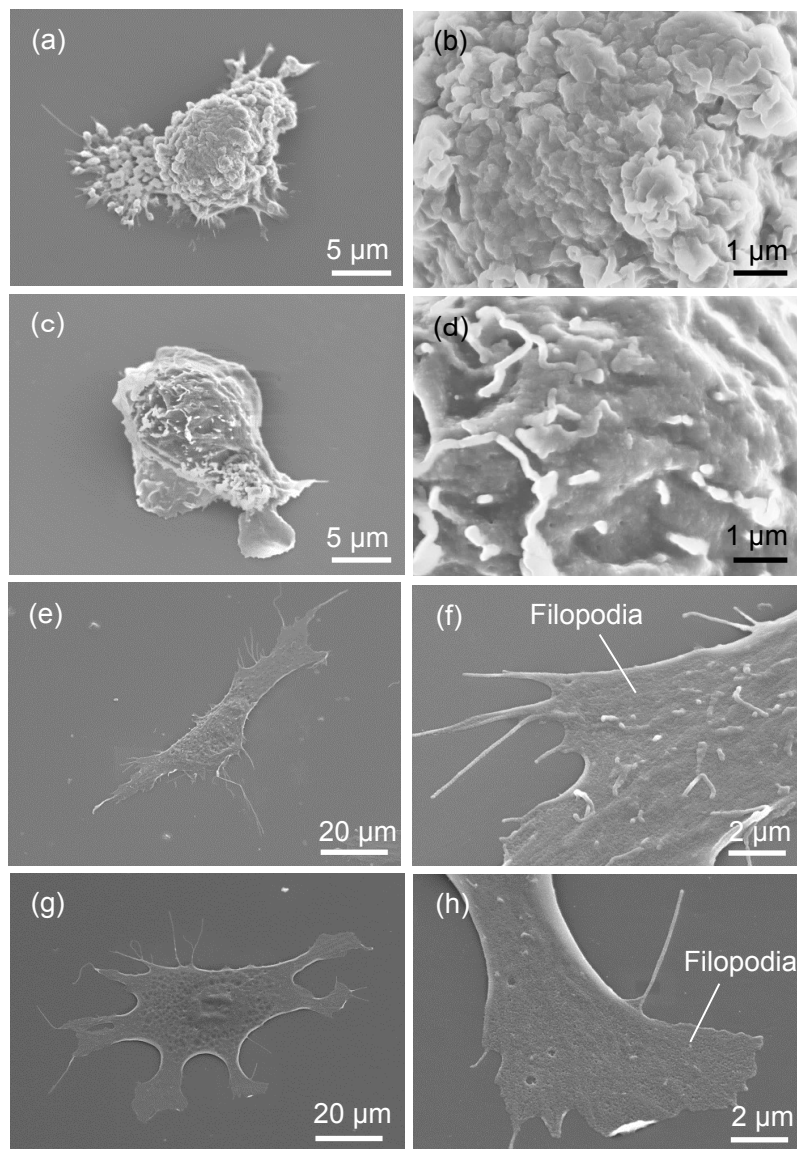


Fig. 4-12 Scanning electron microscope images of chondrocyte on dish. These cells were collected by collagenase and resonance vibration (a), (b), (e) and (f) and, trypsin and pipetting (c), (d), (g) and (h) method. Reseeded cells were cultured for 3 min (a) - (d) and 2 hr (e) - (h).

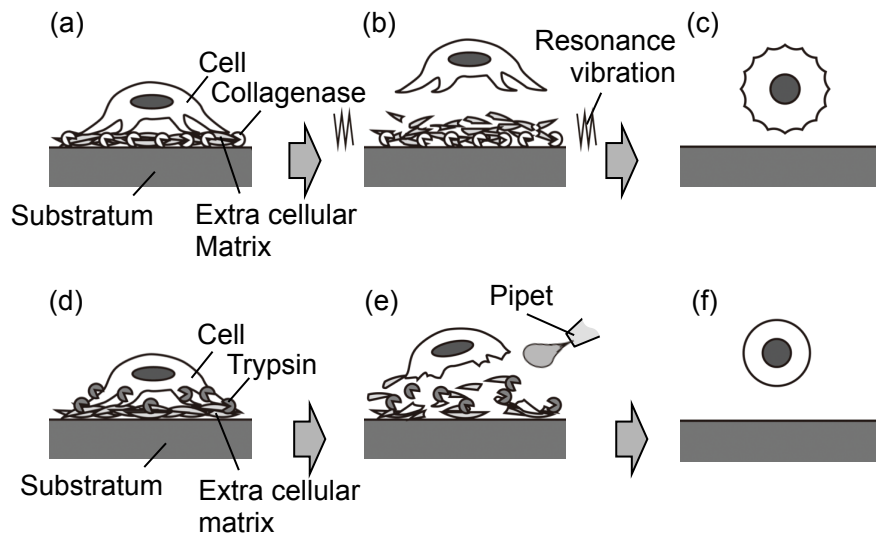


Fig. 4-13 Schematic illustration of cell collecting sequence by (a-c) collagenase and resonance vibration method and by (d-f) trypsin and pipetting method. (a) Collagenase breaks down extra cellular matrix, (b) cell is detached from substrate by vibration, (c) cell membrane is not damaged. (d) Trypsin breaks down extra cellular matrix and cell membrane, (e) cell is detached from substrate by water pressure, (f) cell membrane is damaged.

4.5 コラゲナーゼと固有振動が細胞剥離に及ぼす影響

4.4 節の結果からコラゲナーゼと固有振動による剥離方法はトリプシンとピペッティングによる剥離方法と比較して、細胞の損傷を低減できる点で優れているといえる。しかし、コラゲナーゼと固有振動のうち、どちらの要因が細胞の回収に重要であるかは明らかでない。このため、コラゲナーゼと固有振動がそれぞれ細胞に及ぼす影響を比較した。

4.5.1 固有振動が細胞剥離に及ぼす影響

コラゲナーゼと固有振動、トリプシンと固有振動、および固有振動のみ（それぞれ 4.3.3 の 1, 3, 6 の方法）を用いて剥離し、回収できた細胞数および回収した細胞をインキュベーター内で 72 時間培養した後の細胞数を Fig. 4-14 に示す。Fig. 4-14a から、コラゲナーゼと固有振動、およびトリプシンと固有振動を用いて回収した細胞数は同等であることがわかる。一方で、固有振動のみによる剥離方法は他の 2 つの剥離方法と比較して、回収した細胞数が有意に低下することがわかる。固有振動により回収した細胞数が少ないことから、

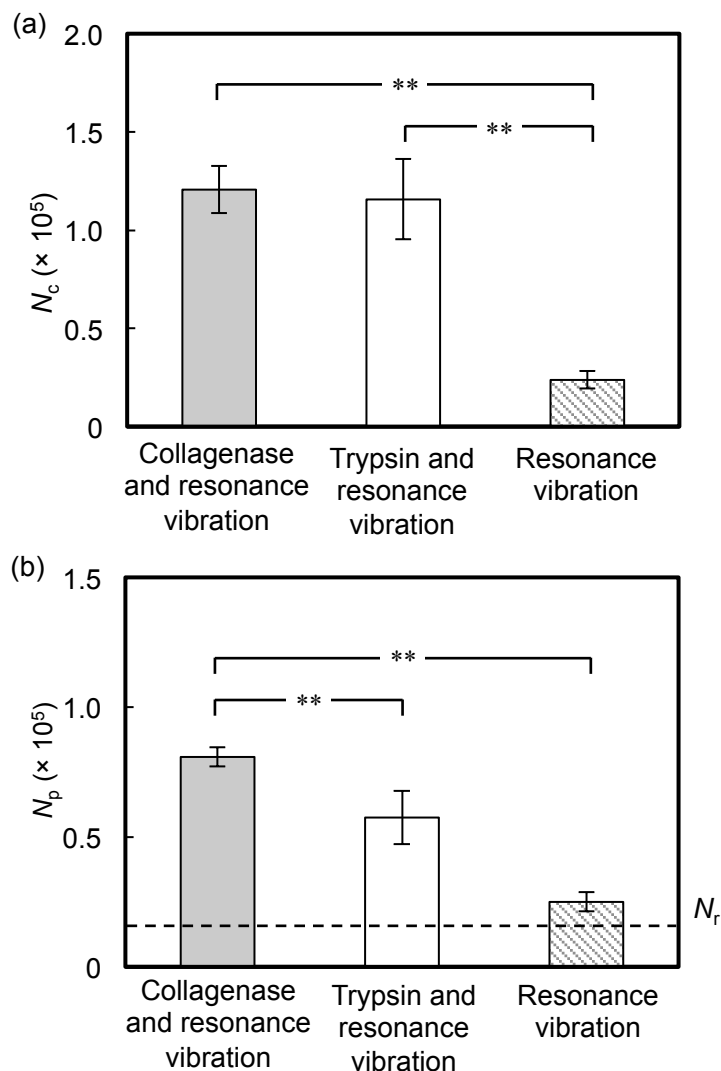


Fig. 4-14 Comparison of the number of (a) collected cells, N_c , and (b) proliferated cells, N_p . (a) Cells are seeded into cell culturing device and cultured for 24 hr, and then collected by either collagenase and resonance vibration method, trypsin and resonance vibration method, and resonance vibration method. (b) Chondrocytes were reseeded after collected by either collagenase and resonance vibration method, trypsin and resonance vibration method, and resonance vibration method and cultured for 72 hr. The number of reseeded cells, N_r , was 1.5×10^4 (mean \pm SD, $n = 4$, **: $p < 0.01$).

4 章 コラゲナーゼと固有振動による細胞の剥離

固有振動のみでは効率的に細胞を回収することが難しいといえる。

また、Fig. 4-14b から、回収した細胞を再度播種し、インキュベータ内で 72 時間培養した後は、コラゲナーゼと固有振動により剥離した細胞数が他の 2 つの剥離方法と比較して最も多いことがわかる。このことから他の剥離方法よりもコラゲナーゼと固有振動により剥離した細胞の増殖性が高いことがわかる。この要因として、トリプシンと固有振動により剥離した細胞はトリプシンの影響により活性が低下したことが考えられる。また、接着性が周囲の細胞と比較して低い細胞には、活性が弱い細胞が多い[42]ことから、固有振動のみでは接着が弱く、活性の低い細胞のみしか剥離することができず、これにより回収した細胞の増殖性が減少したと考えられる。

4.5.2 コラゲナーゼが細胞剥離に及ぼす影響

コラゲナーゼと固有振動、コラゲナーゼとピペッティング、およびコラゲナーゼのみ（それぞれ 4.3.3 の 1, 4, 5 の方法）を用いて剥離し、回収した細胞をインキュベータ内で 72 時間培養した後の細胞数を Fig. 4-15 に示す。Fig. 4-15a から、コラゲナーゼと固有振動による剥離方法は他の 2 つの剥離方法と比較して、回収可能な細胞数が有意に多いことがわかる。コラゲナーゼと固有振動以外の剥離方法の場合には、回収できる細胞数が少ないことから、コラゲナーゼを用いた剥離方法には固有振動を用いる必要があるといえる。

また、Fig. 4-15b から、インキュベータ内で 72 時間培養した後の細胞数については、コラゲナーゼと固有振動による剥離方法とコラゲナーゼとピペッティングによる剥離方法で同等である。このことから、両者の増殖性は同等であり、固有振動が細胞の活性を阻害しないことがわかる。一方で、コラゲナーゼのみにより剥離した細胞の増殖性は他の 2 つの剥離方法と比較して低下することがわかる。これは、固有振動のみを用いて剥離した際と同様に、他の剥離方法と比較して細胞の活性が低い細胞のみが回収されたためであると考えられる。

以上の結果から、固有振動およびコラゲナーゼのみによる細胞剥離では、従来のトリプシンとピペッティングに匹敵するだけの細胞数を剥離することはできない。一方で、コラゲナーゼと固有振動を組み合わせた剥離方法は、従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法に匹敵する細胞数を剥離することが可能であり、回収後の細胞増殖性がトリプシンとピペッティングによる剥離方法と比較して優れることが示された。

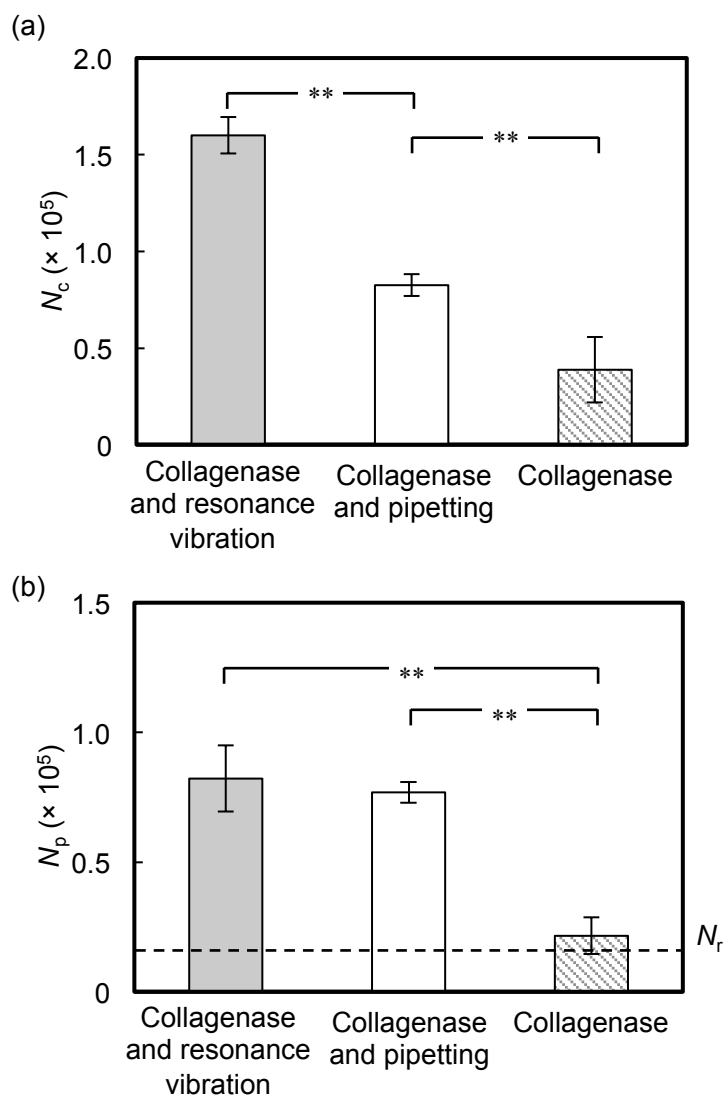


Fig. 4-15 Comparison of the number of (a) collected cells, N_c , and (b) proliferated cells, N_p . (a) Cells are seeded into cell culturing device and cultured for 24 hr, and then collected by either collagenase and resonance vibration method, collagenase and pipetting method, and collagenase method. (b) Chondrocytes were reseeded after collected by either collagenase and resonance vibration method, collagenase and pipetting method, and collagenase method and cultured for 72 hr. The number of reseeded cells, N_r , was 1.5×10^4 (mean \pm SD, $n = 4$, **: $p < 0.01$).

4.6 小括

細胞剥離に使用する酵素のタンパク質分解能力を弱めることで細胞を損傷せずに固有振動により細胞を剥離できる可能性が示されたため、トリプシンよりもタンパク質分解能力が低いコラゲナーゼを固有振動と組み合わせて細胞剥離に用いた。すなわち、金属製培養器の培養面に接着した細胞にコラゲナーゼを散布し、培養面に固有振動を励振して細胞を剥離した。本実験によりコラゲナーゼと固有振動による細胞剥離の有用性と剥離した細胞の活性や様相を調べた。この結果、以下の知見を得た。

- コラゲナーゼと固有振動により培養面から剥離した細胞の数は、従来のトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞数と同等であることが確かめられた。また、回収後の細胞を細胞培養ディッシュに播種して培養すると、コラゲナーゼと固有振動により剥離した細胞の増殖性が、従来のトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞の増殖性と比較して有意に向上することを明らかにした。
- 剥離した細胞の様相を観察した結果、コラゲナーゼと固有振動により剥離した細胞はトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞と比較して大きく、また表面が粗いことを確認した。このことから、タンパク質分解能力の高いトリプシンを用いた際に損傷する細胞表面が、タンパク質分解能力の低いコラゲナーゼと固有振動により剥離した際には損傷しないことが確かめられた。

5 温度刺激と固有振動による細胞の剥離

本章では、3章で製作した金属製培養器を用いて、温度刺激と培養基材の固有振動を組み合わせて細胞の剥離を試みる。具体的には、振動子として構築した金属製培養器の培養基材に温度刺激を付与するために、金属製培養器を温度刺激付与システムに設置する。金属製培養器の培養面を冷却しながら固有振動を励振し、培養面に接着した細胞を剥離する。その後、剥離した細胞を回収し、回収された細胞数を測定して細胞の剥離の有効性を検討する。

5.1 コンセプト

細胞は温度の変化に敏感であり、先行研究では温度刺激（冷却）を与えることで、細胞の接着性が低下することが報告されている。たとえば、Rico ら[114]は、種々の温度低下（24, 16 °C）における CHO 細胞の接着領域が、通常の培養温度（37 °C）で培養した細胞の接着領域と比較して減少し、接着力が低下することを報告している。また、Sagvolden ら[115]は、23 °C の温度下で培養した子宮頸部腫瘍細胞の接着力が、通常の培養温度で培養した細胞と比較して低下することを報告している。さらに、Juliano ら[116]は、11 °C の温度下で培養した CHO 細胞が 33 °C で培養した細胞と比較して初期接着するまでに要する時間が増加すること、さらに 4 °C の温度下では CHO 細胞は基材に接着しないことを報告している。この要因として、培養温度が低下することで、細胞が基材に接着している部分に存在するタンパク質の一種であるフィブロネクチンの発現が低下することが報告されている[117]。

以上の報告は、細胞の接着性が温度に依存して変化することを示すものである。このため、Fig. 5-1 に示すように、温度刺激を用いて細胞の接着力を低下させて、培養基材に固有振動を励振することで剥離を促し、酵素を使用しない細胞剥離法を構築する。

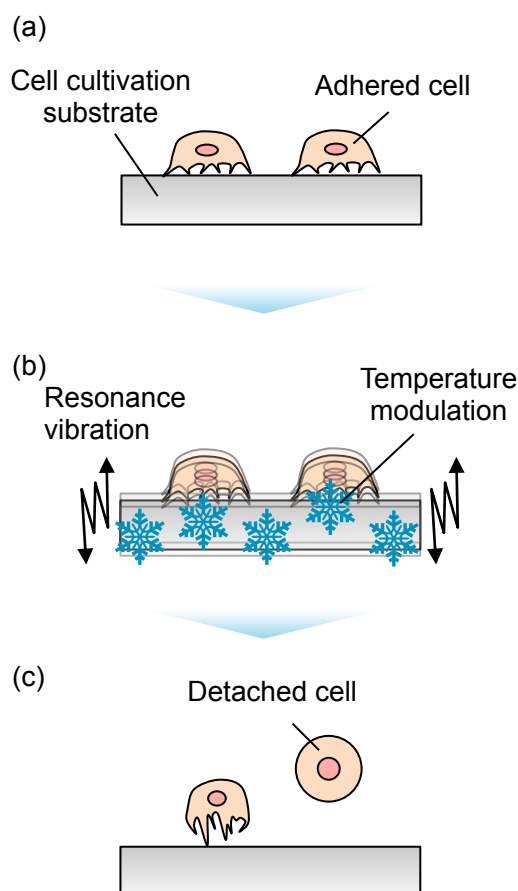


Fig. 5-1 The cell detachment process using resonance vibration with temperature modulation. (a) Cells adhere to the culture base. (b) Resonance vibration of the culture base is excited, and temperature of the culture base is lowered. (c) Cells in medium may be collected by pipetting.

5.2 温度刺激付与システム

5.2.1 温度刺激付与システムの製作

金属製培養器に共振する固有振動を妨げないように、金属製培養器に温度刺激を付与するために3章で製作した培養基材の裏面の圧電素子が接着していない金属部分に温度刺激を付与することとした。このため、製作した培養基材のうち、本実験では温度刺激の付与を行う領域を大きく確保できる3章で用いた正方形の圧電素子を4つ接着した金属製培養基材を用いることとした。

Fig. 5-2a に製作した温度刺激付与システムに金属製培養器を設置した模式図を、Fig. 5-2b

にその写真を示す。温度刺激付与システムは銅基板、ペルチェ素子（TEC1-12706，日本テクノ株式会社，東京，日本），ヒートシンクから構成されており，ヒートシンクの熱交換は水冷クーラー（Sky Water 330L，Larkooler Technology，台湾）により行った。銅基板上に設置した金属製培養器に K 型熱電対（103JT-025，SEMITEC 株式会社，東京，日本）を接着し，ペルチェ素子に PI 制御を行うための配線を接続した。また，Fig. 5-3 に温度刺激を付与する領域と K 型熱電対の設置位置を示す。培養基材と銅基板の密着性を上げるために，培養基材と銅基板の間には生体適合性に優れたグリセロール（17029-00，関東化学株式会社，東京，日本）を塗布した。

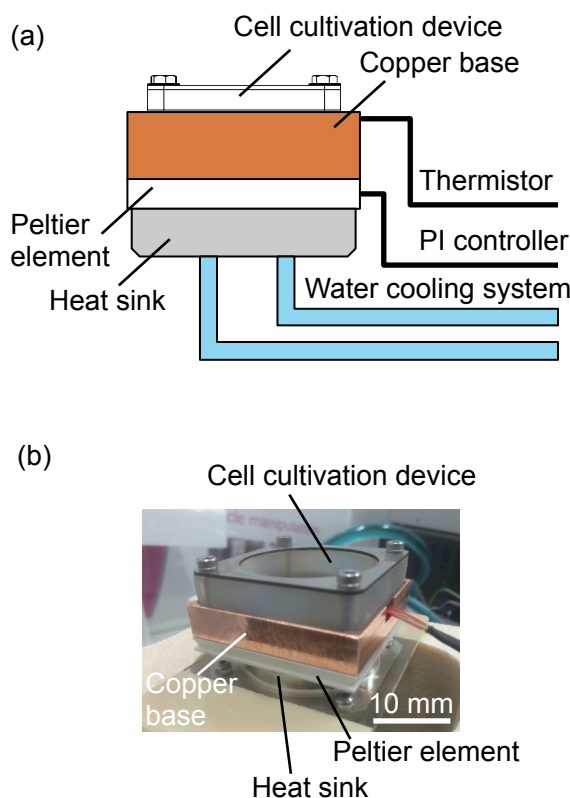


Fig. 5-2 Cell cultivation device with piezoelectric ceramic plates on temperature modulation system. (a) Schematic illustration and (b) photograph of the fabricated device.

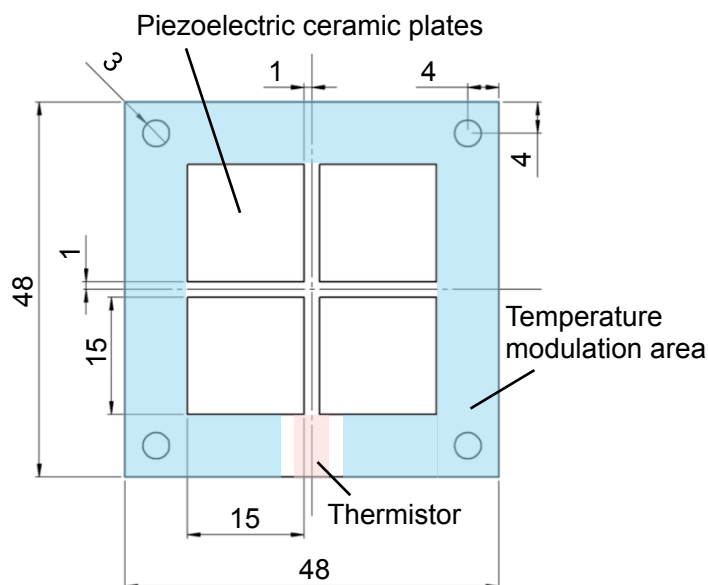


Fig. 5-3 Bottom view of the cell cultivation device with temperature modulation and piezoelectric ceramic plates.

5.2.2 培養基材の温度制御の方法

培養基材の温度はペルチェ素子と K 型熱電対を Arduino (Arduino Duemilanove, Arduino SRL, Turin, Italy) に接続して, Proportional-integral (PI) 制御を用いてコントロールした. PI 制御に用いる回路のブロック図を Fig. 5-4 に示す. なお, Arduino からの信号をペルチェ素子に入力するために Fig. 5-5 に示すドライバ回路を製作し, K 型熱電対から得た温度情報を Arduino にフィードバックするために Fig. 5-6 に示すセンサ回路を製作した.

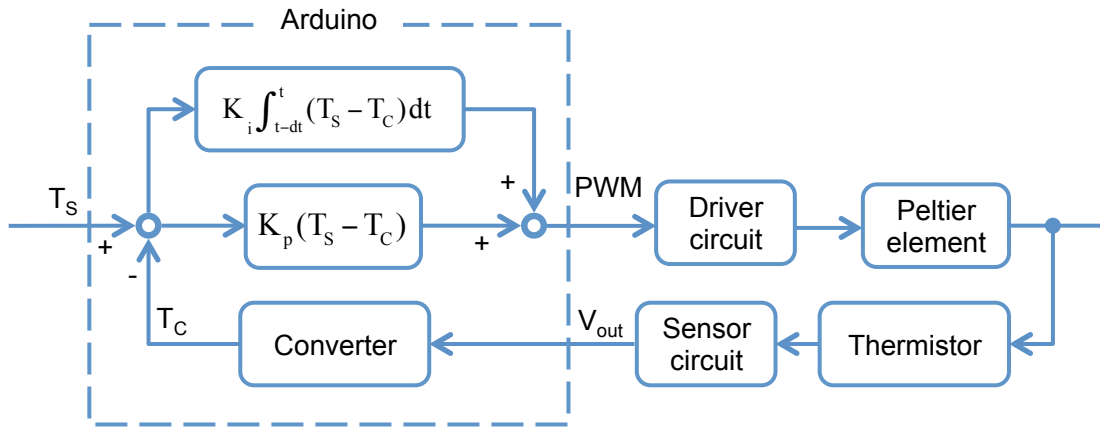


Fig 5-4 Block diagram of temperature feedback control. T_s , T_c and V_{out} are defined as set temperature, current temperature and output voltage, respectively.

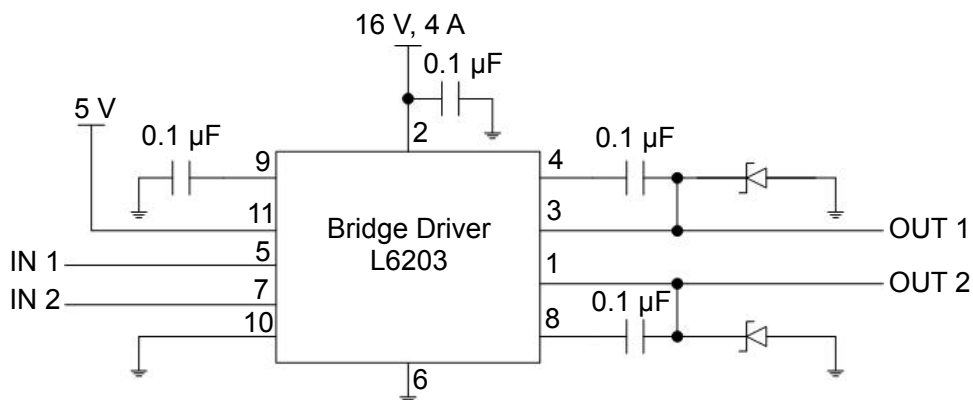


Figure 5-5 Schematic illustration of Peltier device driver circuit.

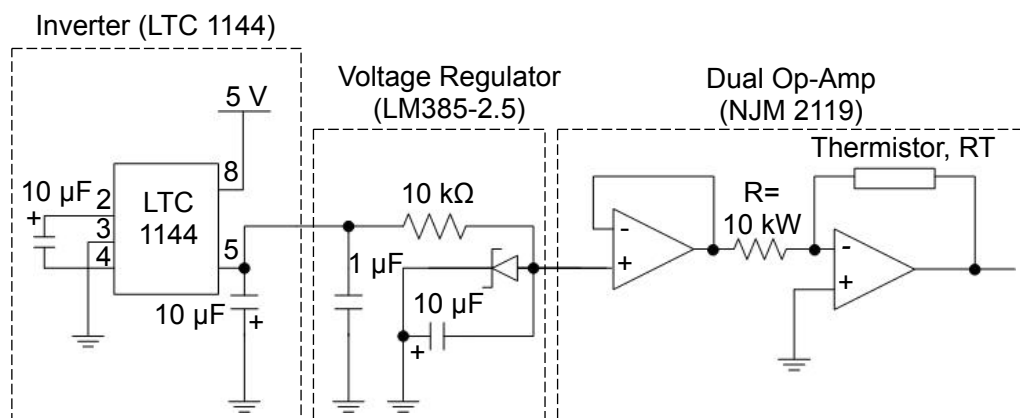


Fig. 5-6 Schematic illustration of thermal sensor circuit.

5.2.3 温度刺激付与システムの冷却特性

製作した温度刺激付与システムの冷却特性を評価した。Fig. 5-7a に目標温度を 0°C に設定した際の培養面の温度履歴を示す。同図から、培養面の温度は 8°C に停滞することがわかる。これは、ペルチェ素子からの放熱をヒートシンクおよび水冷クーラーが完全に放熱できないためである。一方、Fig. 5-7b に目標温度を 10°C に設定した際の培養面の温度履歴を示す。同図から、培養面の温度は 10°C を維持できることがわかる。以上のことから、細胞実験で用いる温度を $10, 20, 30^{\circ}\text{C}$ とした。

5.3 温度刺激と固有振動による細胞剥離実験の方法

本節では、細胞培養実験の準備や温度刺激と固有振動による細胞の剥離方法および細胞剥離方法の有効性の評価方法について説明する。

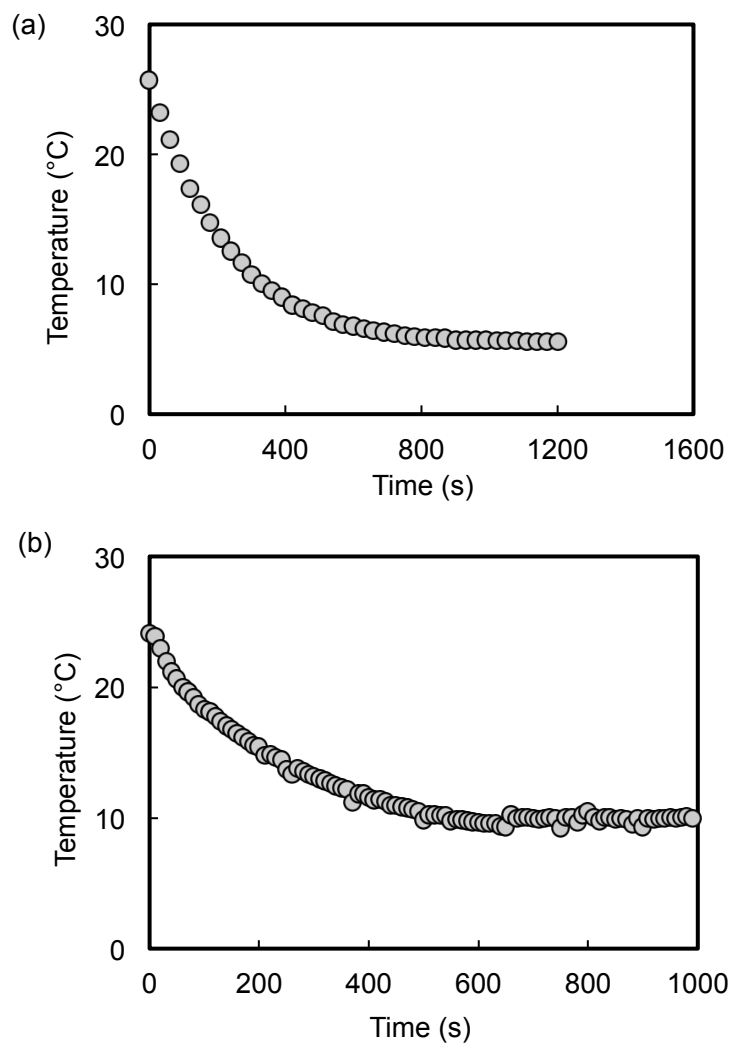


Fig. 5-7 Thermal history of the cell culture device. (a) The limitation of temperature of the cell culture device. (b) Thermal history of the cell culture device controlled to 10 °C.

5.3.1 培養器の準備

製作した金属製培養器を本章で行う温度刺激と固有振動による細胞剥離実験に用いるためには、金属製培養器を滅菌する必要がある。滅菌の方法は 3.3.1 と同様で、以下に具体的に示す。金属製培養器を組み立てる前に、シリコーンゴム壁、金属蓋、シリコーン蓋はオートクレーブ（121 °C，2 気圧，20 分）（LBS-245，TOMY，東京，日本）によりあらかじめ滅菌した。一方、培養基材は、エタノールに浸漬して超音波洗浄し、UV 照射状態でよく乾燥させた。その後、過酢酸（アセサイド，サラヤ株式会社，大阪，日本）に 15 分間浸漬し、培養基材を PBS で十分に洗浄することで滅菌した。

5.3.2 励振する固有振動の条件

本実験では、3.2.2 で製作した培養器を用いることとした。圧電素子を培養基材の裏面に接着した培養器にファンクションジェネレータ（WF-1946B，エヌエフ回路設計ブロック，神奈川，日本）と増幅器（HSA 4011，エヌエフ回路設計ブロック，神奈川，日本）を用いて振動を励振した。励振する固有振動モードを 3 章で用いた円状の節を持つ固有振動モードとするため、入力電圧の周波数を 15.9 kHz とした。なお、Fig. 5-8 に印加電圧と励振される固有振動の最大振幅の関係を示す。同図から、印加電圧を高めても、最大振幅は 3 μm 以下（最大 2.7 μm ）に収束することがわかる。このため、本実験で用いる振幅を 1，2 μm とした。

5.3.3 細胞の準備

本実験では、これまでと比較して汎用性に富んだ知見を得るため、2~4 章と異なりマウス由来の筋芽細胞（C2C12）を用いた。C2C12 はセルラインであり、適切な細胞密度を維持することで培養し続けることが可能なバイオエンジニアリングの研究で一般的に普及している細胞である。理化学研究所のセルバンクから C2C12 細胞株を購入し、細胞を数回継代した後、増殖性が安定した段階で細胞を冷凍保存した。冷凍方法は、細胞を冷凍保存液（セルバンカー，タカラバイオ株式会社，滋賀，日本）に懸濁し、ディープフリーザ（-80 °C）（My Bio，National Health Fund，Warszawa，Poland）内で 1 日保存した後、液体窒素中に保存した。本実験では、この冷凍保存した細胞を解凍後、8 割コンフルエントになった段階で

繰り返し継代し、増殖性が安定することを確認した筋芽細胞を用いた。なお、細胞を培養するための培地にはウシ由来血清 (FBS) (Fetal Bovine Serum, Sigma-Aldrich, MO, US) を 10% 加えたダルベッコ改変イーグル培地/栄養混合物 F-12 ハム (D-MEM/Ham's F-12 with L-glutamine, phenol red, 和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) を用いた。細胞の培養は 75 cm² フラスコ (90075, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) を用いて行い、フラスコに接着した細胞を PBS で 2 度洗浄し、トリプシン (0.05w/v% Trypsin-0.53mmol/l EDTA・4Na Solution with Phenol Red, 和光純薬工業株式会社, 大阪, 日本) を散布して 5 分間インキュベータ (37 °C, CO₂ 5%) (CPE-2600, 株式会社ヒラサワ, 東京, 日本) 内で静置したのち、ピペッティングで剥離、回収して、継代した。

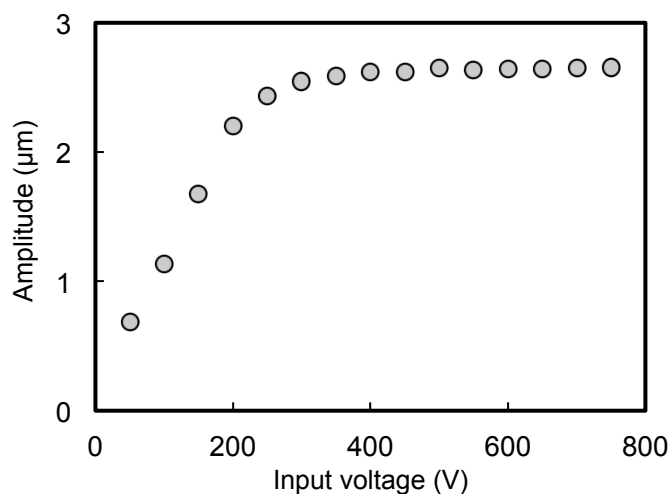


Fig. 5-8 The limitation of vibration amplitude of the cell culture device. Relationship between input voltage and vibration amplitude. Note that the vibration amplitudes were measured at the center of the cell culture base.

5.3.4 細胞の剥離方法

細胞の剥離実験には Table 5-1 に示す 2 つの方法を用いた。以下にそれぞれの方法を詳細に説明する。

1. 温度刺激と固有振動による剥離

10, 20, 30 °C の温度刺激を細胞に付与すると同時に最大振幅 1, 2 μm の固有振動を 10 分間励振して剥離した。その後、細胞懸濁液を回収した。

2. トリプシンとピペッティングによる剥離

0.05% のトリプシン-EDTA に細胞を 5 分間浸漬した後、ピペッティングにより剥離、回収した。

5.3.5 回収した細胞数の測定方法

筋芽細胞 (5.0×10^5 個) を培養器に播種し、24 時間インキュベータ内で培養した。5.3.4 に示した 2 つの方法で、培養面に接着した細胞を剥離し、培地ごと回収した。回収した懸濁液にトリパンプルー (Trypan Blue Solution, 0.4%, Thermo Fisher Scientific, MA, US) を 1 : 1 の割合で添加した後、染色された死細胞を除外して、生細胞のみを血球計算盤により数えた。

Table 5-1 Cell detachment conditions.

	Vibration amplitude (μm)	Temperature (°C)	Trypsin concentration (%)
Temperature modulation and resonance vibration	1, 2	10, 20, 30	-
Trypsin and pipetting	-	-	0.05

5.3.6 回収した細胞の増殖性実験の方法

細胞の活性を調べるために、回収後の増殖性を検討した。5.3.4に示した2つの方法で回収した細胞を $\phi 60$ 細胞培養ディッシュ（3000-035, AGCテクノグラス, 東京, 日本）に 1.0×10^5 個播種し、細胞をインキュベータ内で72時間培養した。その後、トリプシンに3分間浸漬し、ピペッティングにより細胞を回収し、回収した懸濁液にトリパンプルーを1:1の割合で添加した後、染色された死細胞を除外して、生細胞のみを血球計算盤により数えた。

5.3.7 回収した細胞を凍結および解凍した後の増殖性実験の方法

細胞を培養する際には、採取した細胞をすぐに培養する場合と一度凍結保存した後に解凍して培養する場合がある。このため、凍結、解凍した後の細胞の活性を調べることも細胞培養を行うためには重要である。このため、凍結、解凍後の細胞の増殖性を検討した。5.3.4に示した2つの方法で回収した細胞(1.0×10^6 /ml)を凍結保存液(セルバンカー CB013, タカラバイオ株式会社, 滋賀, 日本)に浸漬し、 -80°C のディープフリーザ (VT-78, バイオメディカルサイエンス, 東京, 日本)内で1日凍結した後、液体窒素細胞保存容器 (Biocane 20, Thermo Scientific, MA, US)内に移動し、1週間保存した。その後、解凍して細胞の増殖性を評価した。 $\phi 35$ 細胞培養ディッシュ（3000-035, AGCテクノグラス, 東京, 日本）に 3.0×10^4 個播種し、細胞をインキュベータ内で72時間培養した。その後、トリプシンに3分間浸漬し、ピペッティングにより細胞を回収し、回収した懸濁液にトリパンプルーを1:1の割合で添加した後、染色された死細胞を除外して、生細胞のみを血球計算盤により数えた。

5.3.8 顕微鏡による細胞の観察

細胞の表面を調べるために、位相差顕微鏡と走査型電子顕微鏡により細胞を観察した。

(i) 位相差顕微鏡による細胞の仮足の観察

温度刺激と固有振動および従来のトリプシンとピペッティングで剥離した細胞の仮足の損傷の違いを調べるために、細胞を位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡 (SEM)により観察した。位相差顕微鏡では、温度刺激と固有振動、および従来のトリプシンとピ

5 章 温度刺激と固有振動による細胞の剥離

ペッチングで剥離し、回収した細胞を $\phi 35$ 培養ディッシュ (3000-035, AGC テクノグラス, 東京, 日本) にそれぞれ再度播種して, 位相差顕微鏡 (ECLIPSE TS100, 株式会社ニコン, 東京, 日本) で観察して比較した.

(ii) 走査型電子顕微鏡による細胞の表面の観察

走査型電子顕微鏡 (SEM) では, 温度刺激と固有振動, および従来のトリプシンとピペッチングで剥離し, 回収した細胞を $\phi 35$ 培養ディッシュに播種して, 5 分間インキュベータ内で培養した細胞を細胞の接着直後の細胞の仮足の様子を比較するために用意した. 2. 3. 4 に示した方法と同様に, 2.5%グルタルアルデヒド水溶液 (和光純薬工業株式会社, 東京, 日本) に 20 分間浸漬することで固定した後に, エタノール水溶液 (20, 50, 80%) に 15 分ずつ浸漬して徐々に脱水した. 100%エタノールで洗浄した後, 100%エタノールに 30 分間浸漬して, 完全に脱水した. その後, t-ブチルアルコール (東京化成工業株式会社, 東京, 日本) に 15 分間浸漬したのち, 新しい t-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥した. 凍結乾燥した試料を t-BuOH 凍結乾燥機 (VFD-21S, 株式会社真空デバイス, 茨城, 日本) により昇華させて細胞を乾燥させた. その後, オスミウムコーター (HPC-1S, 株式会社真空デバイス, 茨城, 日本) により細胞試料をオスミウムコーティングして, SEM で観察した. なお, 加速電圧は 2.0 kV に設定した.

5.3.9 細胞の表面タンパク質の測定

剥離した細胞に含まれるタンパク質を調べるために, 電気泳動を行った後にウェスタンブロッティングによりタンパク質を測定した. 具体的には, Sodium dodecyl sulfate-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) の緩衝液 (250 μ L/2.5 x 10⁴ cells, 50 mM Tris-HCl (pH 6.8)/75 mM dithiothreitol/2% SDS/10% glycerol/0.001% bromophenol blue) に細胞を溶解し, 70 °C で 5 分間加熱した. SDS-PAGE に溶解した細胞のタンパク質をポリフッ化ビニリデンのメンブレンに転写した. メンブレンと抗体との非特異な結合を防ぐために, メンブレンを Blocking One (Nacali Tesque, 京都, 日本) に 30 分間浸漬した. その後, Tris Buffered Saline (TBS) 中 5%濃度の Blocking One に 2 μ g/mL の mouse anti-chicken myosin heavy chain (MHC) monoclonal antibody (MF20 ; R&D systems, Minneapolis, MN, US), 0.4 μ g/mL の rabbit anti-human leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) polyclonal antibody (22779-1-AP ; Proteintech, Rosemont, IL, US), 2 μ g/mL の rabbit anti-human integrin $\alpha 7$ polyclonal antibody (ab203254 ; Abcam, Cambridge, MA, US), さらにローディングコントロールとして 1000

倍希釈した rabbit anti-mouse β -actin polyclonal antibody (#4967 ; Cell signaling technology, Boston, MA, US) を加えて, 12 時間攪拌し, 一次抗体反応させた. これらのタンパク質を選択した理由は, MHC が細胞内部のタンパク質であるのに対して, LIFR と Integrin α 7 は細胞表面のタンパク質である. このため, 細胞の剥離方法によりこれらのタンパク質にどのように変化が生じるか観察することで細胞の表面の損傷を確認することができる. その後, 0.05%濃度の Tween 20 を TBS に加えた TBST で 3 回洗浄し, 抗マウス IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) および抗ウサギ IgG (Perkin-Elmer, Waltham, MA, US) をペルオキターゼで 10000 倍に希釈した溶液で 30 分間攪拌し, 二次抗体反応させた. TBST にて洗浄後, イモビロンウェスタン化学発光 HRP 基質 (Millipore, Billerica, MA, US) を用いて, FluorChem Q image analyzer (ProteinSimple, San Jose, CA, US) によりタンパク質のバンドの画像の撮影と解析を行った. 各バンドの濃度は β -actin バンドにより正規化し, トリプシンとピペッティングにより剥離した細胞のタンパク質量を基準とした. なお, 比較としてセルスクレーパ (Cell Spatula, TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) により剥離, 回収した細胞もタンパク質を測定した.

5.4 温度刺激と固有振動による細胞剥離実験の結果 および考察

5.4.1 異なる温度刺激を付与した際に剥離した細胞数

励振する振動振幅を固定し, 5.3.4 で述べた方法を用いて, 細胞を剥離し, 回収した細胞数を調べた. Fig. 5-9 に最大振幅 $2\ \mu\text{m}$ の固有振動を励振し, 異なる温度刺激 ($10, 20, 30\ ^\circ\text{C}$) を付与した剥離, およびトリプシンとピペッティングを用いた剥離により回収した細胞数を示す. 同図より, 付与する温度刺激の目標温度を低下させるほど, 剥離する細胞数が向上することがわかる. とくに, 付与する温度刺激を $10\ ^\circ\text{C}$ とした際には, 本実験で用いた温度付与条件の中で最も細胞数を回収できることがわかる. このことから, 付与する温度を低下させることで, 細胞が剥離しやすくなることが明らかとなった.

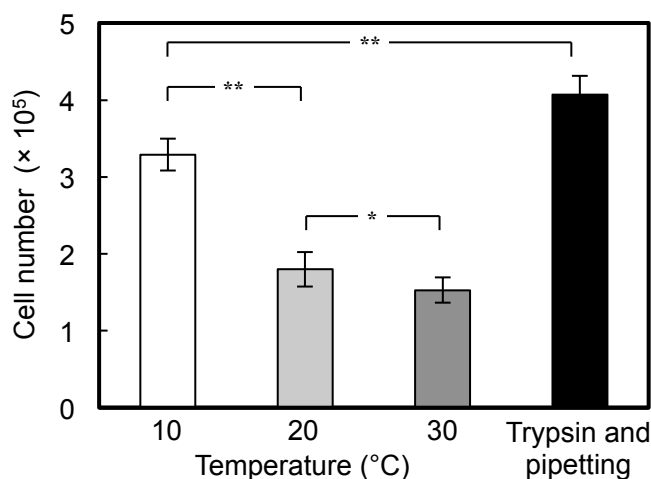


Fig. 5-9 Comparison of number of cells. Cells were seeded into the cell culture device and cultured for 24 hr and then detached using temperature modulation and resonance vibration, and trypsin and pipetting as a control. Vibration amplitude was $2 \mu\text{m}$, and targeted temperatures were 10, 20 and 30 °C. The number of seeded cells were 5.0×10^5 (mean \pm SD, $n = 4$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

5.4.2 異なる振幅の固有振動を励振した際に剥離した細胞数

付与する温度刺激を固定し、5.3.4で述べた方法を用いて、細胞を剥離し、回収した細胞数を調べた。Fig. 5-10に付与する温度刺激を10 °Cとし、異なる振幅（1, 2 μm ）の固有振動を励振した剥離、およびトリプシンとピペッティングを用いた剥離により回収した細胞数を示す。同図より、励振する固有振動の振幅を増加させるほど、剥離する細胞数が向上することがわかる。とくに、励振する固有振動の最大振幅を2 μm とした際には、励振する固有振動の最大振幅を1 μm のときと比較して有意に多くの細胞数を回収でき、トリプシンとピペッティングを用いた剥離方法の78%の細胞数を回収できる。このことから、励振する固有振動の振幅を増加させることで、細胞が剥離しやすくなることが明らかとなった。

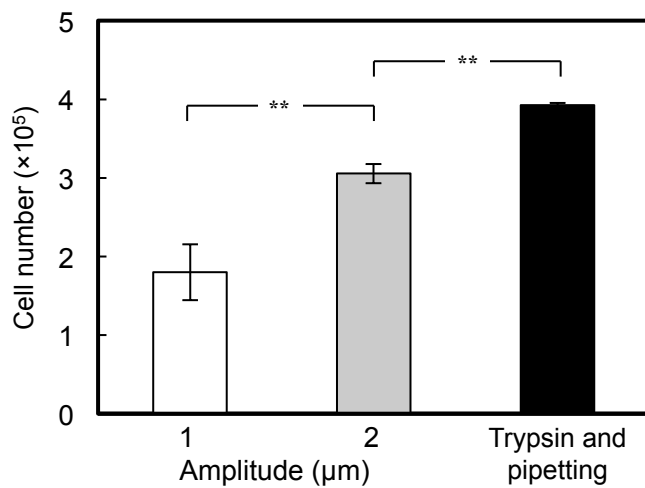


Fig. 5-10 Comparison of number of cells. Cells were seeded into the cell culture device and cultured for 24 hr and then detached using temperature modulation and resonance vibration, and trypsin and pipetting as a control. Vibration amplitude was 1 and 2 μm with a temperature of 10 $^{\circ}\text{C}$. The number of seeded cells were 5.0×10^5 (mean \pm SD, $n = 4$, **: $p < 0.01$).

5.4.3 回収した細胞の増殖性

5.3.6に示す方法を用いて剥離，回収した細胞の増殖性を調べた．なお，温度刺激と固有振動により細胞を剥離する際には，最も細胞を回収することができた条件である目標温度 10°C ，最大振幅 $2\ \mu\text{m}$ として細胞を剥離，回収した．Fig. 5-11 に，剥離した細胞を 72 時間培養した後の細胞数を示す．Fig. 5-11 より，従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法と温度刺激と固有振動を用いた剥離方法では，回収後の細胞の増殖性が同様であることがわかる．この要因として，温度低下による細胞増殖性の低下が考えられる．Underhill ら[118]は HeLa 細胞を 10°C の温度下で 24 時間培養することで， 37°C の温度下で培養した場合と比較して増殖性が半減すると報告している．また，Kaufmann ら[119]は培養環境を 37°C から 30°C に変化させることで，増殖性が低下することを報告している．このように，周囲の温度が低下することで，細胞の増殖性は低下してしまう．一方で，細胞の剥離酵素を用いずに細胞を剥離したために，細胞の表面は損傷せずに細胞の活性が維持された．以上のことから，温度低下により細胞の増殖性は低下する一方で，細胞の表面が損傷せずに活性が維持されたことで，酵素フリーの剥離方法で従来のトリプシンとピペッティングと同等の細胞活性を維持したと考えられる．

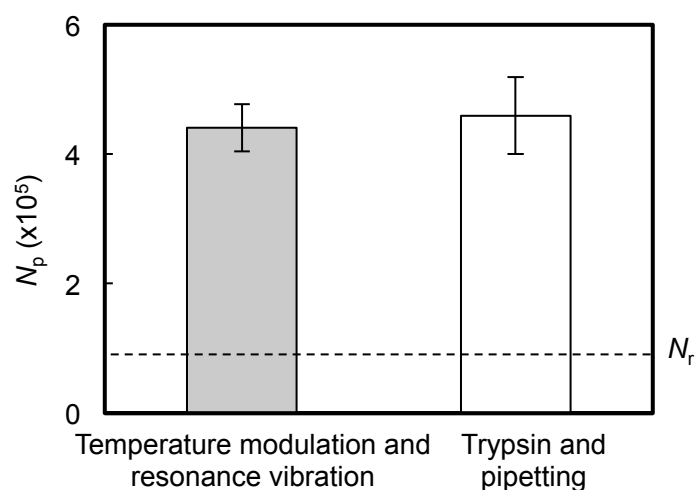


Fig. 5-11 Comparison of the number of proliferated cells, N_p . Cells were cultured for 72 hr after collection using temperature modulation and resonance vibration method, and trypsin and pipetting method. The number of reseeded cells, N_r , is 1.0×10^5 (mean \pm SD, $n = 8$).

5.4.4 回収した細胞を凍結および解凍した後の増殖性

5.3.7に示す方法を用いて剥離，回収した細胞を凍結，解凍した後の増殖性を調べた．なお，温度刺激と固有振動により細胞を剥離する際には，5.4.3と同様に最も細胞を回収することができた条件である目標温度 10°C ，最大振幅 $2\ \mu\text{m}$ として細胞を剥離，回収した．Fig. 5-12に，剥離した細胞を凍結，解凍して72時間培養した後の細胞数を示す．Fig. 5-12より，従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法と比較して温度刺激と固有振動を用いた剥離方法では，細胞の増殖性が増加することがわかる．Fig. 5-11では細胞の増殖性に有意な差が認められないのに対して，Fig. 5-12では有意な差が認められたことから，凍結した場合には両方法ともに温度低下による一時的な細胞増殖性の低下が生じたと考えられる．すなわち，温度刺激と固有振動により細胞を剥離した際には，温度低下により細胞の増殖性は低下する一方で，細胞の表面が損傷せずに活性が維持された．これにより，温度刺激と固有振動により剥離した細胞を凍結，解凍後の細胞の増殖性は，従来のトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞の増殖性と比較して向上したと考えられる．

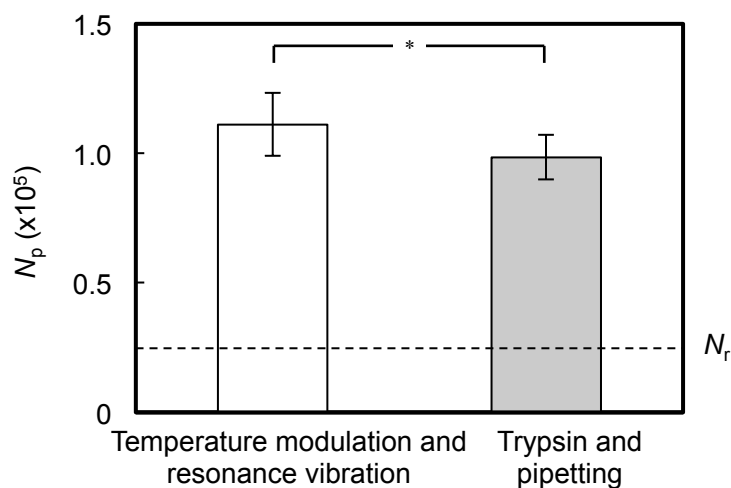


Fig. 5-12 Comparison of the number of proliferated cells, N_p . Cells were cultured for 72 hr after collection using temperature modulation and resonance vibration method, and trypsin and pipetting method and then freezing and thawing. The number of reseeded cells, N_r is 3.0×10^4 (mean \pm SD, $n = 8$, *: $p < 0.05$).

5.4.5 回収した細胞の様相

5.3.8で述べた方法を用いて、回収した細胞を位相差顕微鏡とSEMにより観察した。Fig. 5-13a, bに温度刺激と固有振動、およびトリプシンとピペッティングにより剥離、回収した細胞を位相差顕微鏡により観察した様相を示す。これらの結果から、従来のトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞が球状であるのに対して、温度刺激と固有振動により剥離した細胞は仮足を伸展して多角形状であることがわかる。温度刺激と固有振動により回収した細胞の形状が多角形状となる要因として、酵素を用いずに細胞を剥離したために仮足が分解されずに残存したためであると考えられる。

Fig. 5-13c-fに温度刺激と固有振動、およびトリプシンとピペッティングにより回収した細胞を培養ディッシュに播種して、インキュベータ内で5分間培養し、培養面に接着した細胞をSEMにより観察した結果を示す。Fig. 5-13c-fから、トリプシンとピペッティングにより剥離した細胞の表面がなめらかな状態であるのに対して、温度刺激と固有振動により剥離した細胞の表面は粗いことがわかる。4.4.2で述べたようにトリプシンにより剥離した細胞の表面と比べて細胞膜のタンパク質が酵素により分解されずに残存した際には、粗い表面となること[113]が報告されている。このことから、温度刺激と固有振動により剥離した細胞では細胞膜を構成するタンパク質が残存したといえる。

以上の結果から、温度刺激と固有振動により剥離した際には、細胞膜の表面を分解せず細胞を剥離、回収できたと考えられる。

5.4.6 回収した細胞の表面タンパク質

細胞の表面のタンパク質が温度刺激と固有振動により分解せずに残存するか否かを調べるために、剥離後の細胞のタンパク質をウェスタンブロッティングにより分析した。

Fig. 5-14aにMHC, LIFR, Integrin α 7, そして β -actinのバンドの結果を示す。なお、図中の $M_{t\&r}$ は温度刺激と固有振動により剥離した細胞を、 $M_{t\&p}$ はトリプシンとピペッティングにより剥離した細胞を、 M_{scr} はセルスクレーパにより剥離した細胞を示す。同図より、ローディングコントロールである β -actinとMHCは測定した3種類とも同等であることがわかる。また、Fig. 5-14bからもMHCに有意な差は認められない。これは、MHCは細胞内部に存在するタンパク質のため、温度刺激と固有振動、トリプシンとピペッティング、および

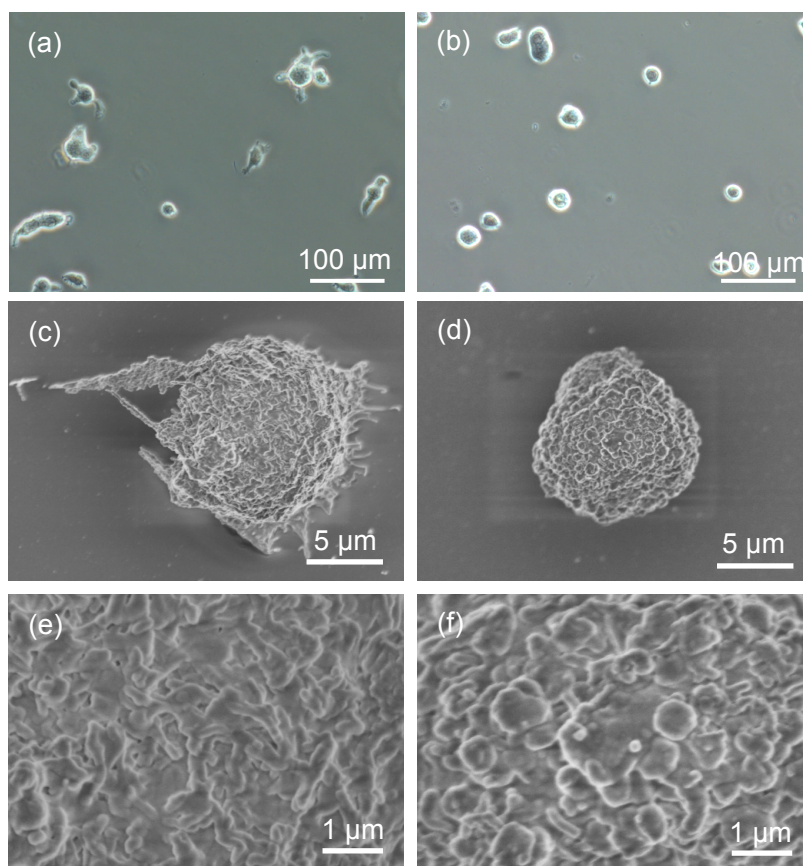
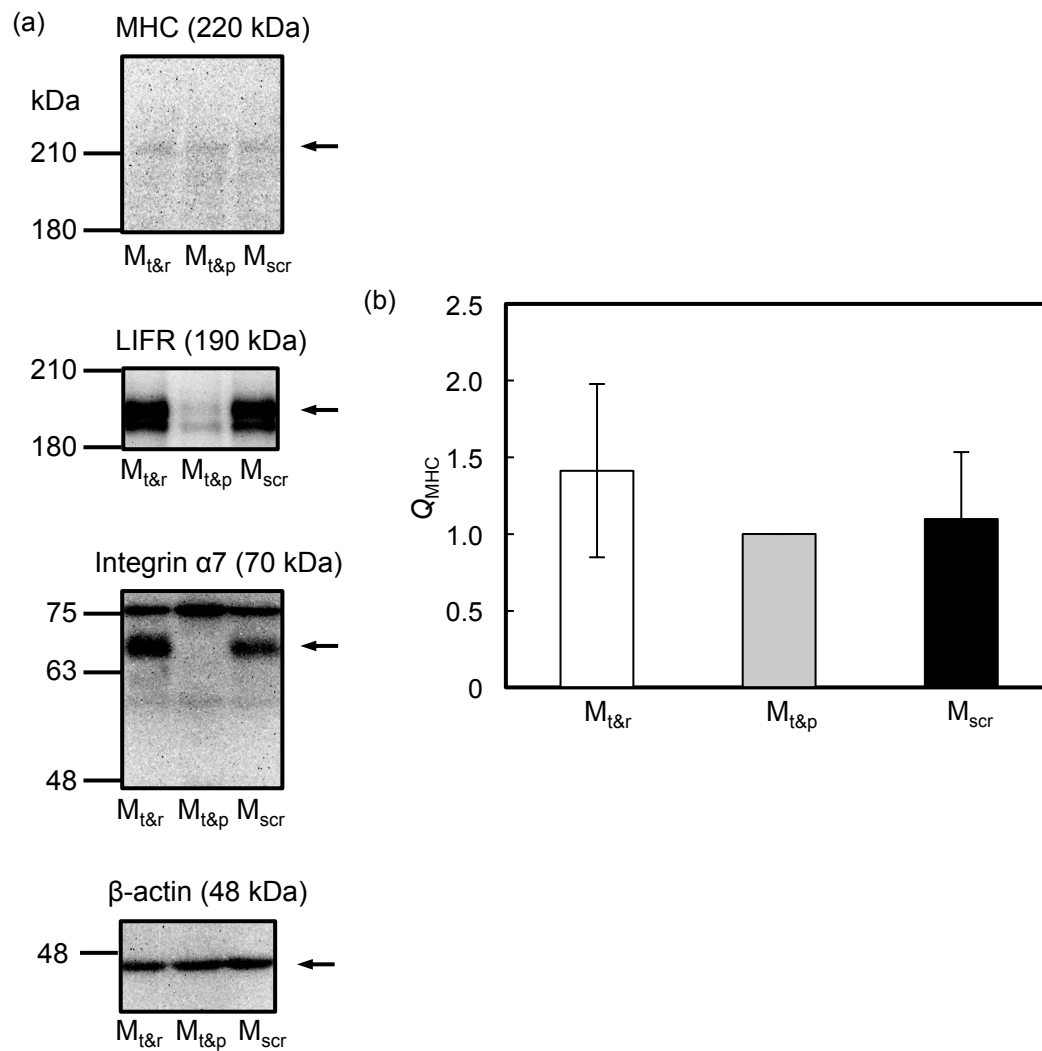


Fig. 5-13 Comparison of cell shapes and surfaces. Cell images taken by (a) and (b) a phase contrast microscope and (c) - (f) a scanning electron microscope (SEM). Cells seeded after detachment by (a), (c) and (e) the temperature modulation and resonance vibration, and (b), (d) and (f) trypsin and pipetting.

セルスクレーパのいかなる方法で剥離した際にも細胞にタンパク質が残存する。一方で、LIFR (Fig. 5-14c) と Integrin $\alpha 7$ (Fig. 5-14d) は温度刺激と固有振動、セルスクレーパで剥離した細胞には残存しているが、トリプシンとピペッティングにより剥離した細胞には残存していない。このことから、細胞表面に存在するタンパク質は、トリプシンとピペッティングにより剥離した際には分解するのに対して、温度刺激と固有振動により剥離した細胞には、セルスクレーパで剥離したときと同様に細胞の表面に存在するタンパク質が残存することが明らかとなった。



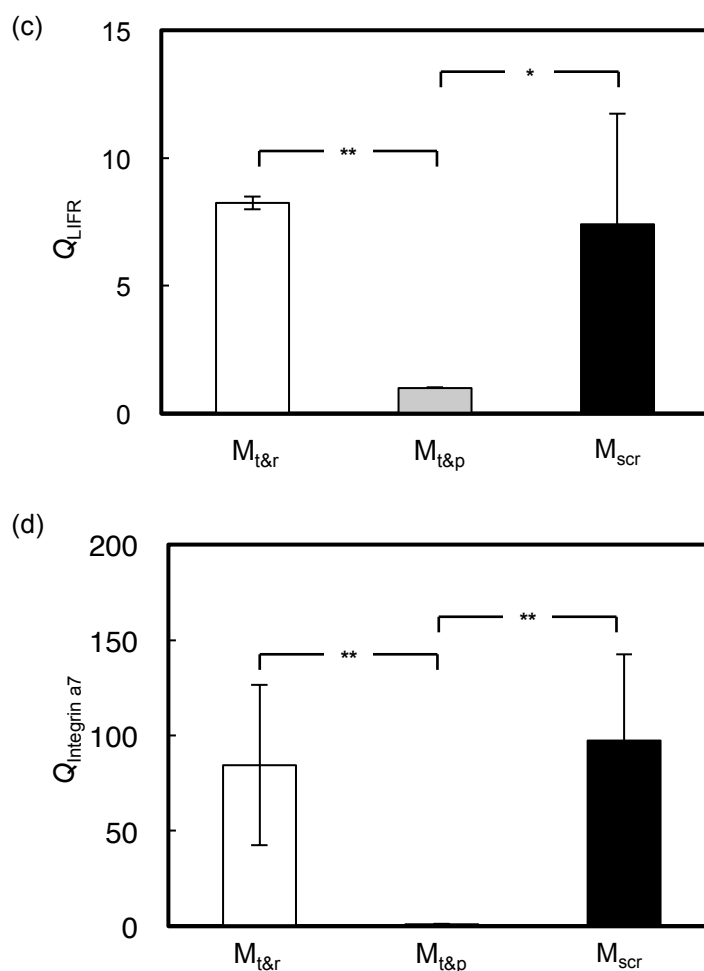


Fig. 5-14 Comparison of protein quantities in cells. Cells collected by the temperature modulation and resonance vibration proposed method, $M_{t\&r}$, trypsin and pipetting, $M_{t\&p}$ and the scraper method, M_{scr} , were lysed in SDS-PAGE sample buffer, and the proteins were analyzed using western blotting with the following antibodies (a): anti-myosin heavy chain (MHC, first panel), anti-leukemia inhibitory factor receptor (LIFR, second panel), anti-integrin $\alpha 7$ (third panel), and anti- β -actin (fourth panel). Arrows indicate the target bands. Relative protein quantities (Q) of MHC (b), LIFR (c), and integrin $\alpha 7$ (d) were measured using their band densities on western blotting. Protein quantities were normalized to the band density of β -actin. The data are expressed as means with SD ($n = 4$, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$).

5.5 小括

4章にて、コラゲナーゼを固有振動と組み合わせることで細胞の活性を維持した状態での細胞の剥離を実現した。しかし、細胞の剥離には依然として酵素を使用している。本章では、細胞の損傷をさらに低減するために、酵素フリーの剥離方法の構築を目指し、固有振動と温度刺激を組み合わせることで細胞剥離を試みた。すなわち、金属製培養器の培養面に温度刺激を付与し、同時に固有振動を培養面に励振して細胞を剥離した。この結果、以下の知見を得た。

- ペルチェ素子を用いて、金属製培養器に温度刺激を付与できるシステムを製作した。本システムを用いることで培養基材の温度を 8 °C まで低下させることができる。また、製作した金属製培養器に円状の節を持つ固有振動モードを励振した際の最大振幅は 2.7 μm まで達することが確かめられた。
- 温度刺激（目標温度 10 °C）と固有振動（最大振幅 2 μm ）を用いることで、従来のトリプシンとピペッティングを用いて細胞を剥離した際の 78%の細胞数を剥離、回収できることが確かめられた。
- 回収した細胞の増殖性は従来のトリプシンとピペッティングにより回収した細胞と同等であることが確かめられた。この要因として、温度低下による細胞増殖性の低下の可能性が示唆された。
- 位相差顕微鏡および走査型電子顕微鏡による観察とウェスタンブロッティングによるタンパク質分析の結果から、温度刺激と固有振動により回収した細胞の表面は損傷せずに表面のタンパク質が残存することが確かめられた。すなわち、酵素を用いずに剥離することで細胞の表面を損傷せずに回収できるが、温度低下が増殖性の低下を引き起こしたため、細胞の増殖性は従来と同等となった。

6 結論

本研究では、培養基材の固有振動を励振できる細胞培養デバイスを具現化し、超音波域の固有振動により細胞を剥離する手法を確立し、細胞を剥離するために必要な条件を検討することとした。具体的には、SUS316L 基材を用いた金属製細胞培養器を製作し、固有振動とトリプシン、コラゲナーゼおよび温度刺激を組み合わせ、基材から活性の高い細胞を効率的に剥離する手法を確立し、剥離した細胞の様相を観察した。

はじめに、アルミナ粒子を用いて FPP 処理を施した培養基材を用いて金属製細胞培養器を製作し、この金属製細胞培養器が細胞培養に一般的に用いられている高分子製の細胞培養ディッシュと同等の細胞増殖性を示すことを確認した。これにより、本研究で製作した金属製細胞培養器が従来の培養ディッシュと同等の細胞培養能力を有しており、細胞培養器として有効であることを示した。

つぎに、金属製細胞培養器に圧電素子を具備して振動子とし、これを用いてトリプシンと固有振動により細胞を剥離、回収した。その結果、異なる振動振幅で固有振動を励振することで、剥離あるいは残存する細胞数を調節できることが示された。また、濃度を薄めた剥離効果の弱いトリプシン（酵素）と固有振動を組み合わせることで、通常の濃度のトリプシンとピペッティングを用いた従来方法と比較して回収および培養基材に残存する細胞の活性が向上することから、濃度の薄いトリプシンを用いた際には、剥離、残存した細胞の活性がともに維持されることが示唆された。

トリプシンと固有振動による細胞剥離の知見から、細胞を剥離するために用いる酵素のタンパク質分解能力を弱めることで細胞を損傷せずに固有振動により細胞を剥離できる可能性が示された。このため、つぎにトリプシンと比較してタンパク質分解能力の低い酵素のひとつであるコラゲナーゼを固有振動と組み合わせ、仔ウシ由来軟骨細胞を剥離し、回収した細胞数を測定し、その増殖性を評価した。コラゲナーゼと固有振動による剥離方法は、トリプシンとピペッティングによる従来の剥離方法と比較して同等の細胞数を回収可能であり、回収後の細胞の増殖性は有意に向上することが確かめられた。この結果から、タンパク質分解能力の低い酵素を固有振動と組み合わせることで、トリプシンとピペッティングによる従来の剥離方法と比較して、細胞の活性が高い状態で回収することが可能であることを示した。

最後に、振動子を接着した培養器の基材底面にペルチェ素子により温度刺激を付与するための温度刺激付与システムを製作し、温度刺激と固有振動により細胞を剥離し、回収した細胞数を測定した。その結果、酵素を使用せずに温度刺激と固有振動のみで従来のトリプシンとピペッティングによる剥離方法で回収できる細胞数のおよそ 8 割の生細胞の回収を実現した。また、トリプシンとピペッティングにより剥離した細胞とは異なり、温度刺激と固有振動により回収した細胞

膜は損傷せずに、表面のタンパク質が残存することが明らかとなった。

以上のように、本研究では培養基材の固有振動をトリプシン、コラゲナーゼ、温度刺激と組み合わせることで細胞を剥離する方法を構築し、その有効性を示した。また、細胞を剥離する際には酵素や温度刺激などの細胞の仮足の接着を低減する剥離のきっかけと固有振動のように細胞に物理的な刺激を与えることで活性を維持した状態で細胞を剥離、回収することができることが確かめられた。とくに、剥離のきっかけにタンパク質を分解せずに細胞の接着を低減できる方法（温度刺激）を用いることで細胞を損傷せずに回収できることが示された。

これらの細胞の剥離と回収に関する知見は細胞の大量培養を行う上で重要であり、本研究で提案したコラゲナーゼと固有振動による剥離方法は、継代後の細胞増殖が従来のトリプシンとピペッティングによる細胞剥離方法と比較して有意に向上したことから大量培養への応用が期待できる。また、固有振動と温度刺激を組み合わせると、酵素フリーで物理的な刺激のみで細胞を剥離、回収することができる。この剥離方法では、温度低下による細胞増殖性の低下が確認されたが、今後は温度刺激の付与条件をさらに詳細に検討することで活性を高く維持した状態で酵素を用いずに細胞を剥離できる可能性がある。

謝 辞

本研究を進めるにあたり，多大なるご指導，ご助言を賜りました慶應義塾大学理工学部 竹村 研治郎准教授に心より感謝の意を表します。竹村准教授には，研究に関するご意見だけでなく，研究者としての在り方や国際人としての思考，さらには教育者としての良識など，多くの貴重なご指導も賜りました。

本研究に対するご助言とともに，日頃より多大なるご指導をいただきました慶應義塾大学理工学部 小茂鳥潤教授，宮田昌悟准教授に心より感謝いたします。本論文の審査過程において副査を務めていただき，様々なご助言とご指導をいただきました泰岡顕治教授，尾上弘晃准教授に深く感謝申し上げます。

博士課程での研究生活において，博士課程教育リーディングプログラムの一環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ご支援を受けました。とくに，慶應義塾大学理工学研究科コーディネーター 植田利久教授には，プログラムを遂行する上で多くのご助言やご指導いただき，心より感謝いたします。また，同プログラムの副専攻の研究を進めるにあたり，多くのご助言やご指導いただいた環境情報学部 倉林修一特任准教授に深く感謝申し上げます。さらに，同プログラムの国際トレーニングにてご指導いただき，その後も継続的にご助言いただいたカルフォルニア大学サンディエゴ校 James Friend 教授に心よりお礼申し上げます。

細胞の生化学的な分析方法から実験まで多くのご助言やご指導をいただいた成蹊大学理工学部 戸谷希一郎准教授，平野真助教に深く感謝申し上げます。また，デバイスの設計から製作，実験の方法まで多くのご助言をいただきました慶應義塾大学マニファクチュアリングセンター，中央試験所，機械系共通実験室，テクノロジーセンターの職員の皆様にも心より感謝いたします。

研究を遂行するにあたり，経済的な支援をいただいた，日本学術振興会，独立行政法人日本学生支援機構，若手研究者育成ものづくり特別事業（石井・石橋基金）の関係者の皆様には心より感謝いたします。

慶應義塾で共に過ごした慶應義塾大学理工学部機械工学科 竹村研究室ならびに小茂鳥研究室の諸先輩方，同輩，後輩諸君に深く感謝いたします。また，細胞勉強会を開催するためにご協力いただいた，前田知貴助教，宮田研究室，尾上研究室の学生諸君に心より感謝いたします。

最後に，日頃の生活を支えてくれた家族に心から深く感謝します。

2016年10月研究室にて

倉科 佑太

本研究に関する業績

学術論文

- [1] 倉科佑太, 浜野拓巳, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “微細表面凹凸を有するステンレス鋼表面における仔ウシ由来軟骨細胞の増殖性と培養ディッシュへの応用,” *日本金属学会誌*, vol. 78, no. 4, pp. 170-176, 2014, DOI: 10.2320/jinstmet.J2013070.
- [2] Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Shogo Miyata, Jun Komotori and Tadayoshi Koyama, “Effective cell collection method using collagenase and ultrasonic vibration,” *Biomicrofluidics*, vol. 8, no. 054118, pp. 1-16, 2014, DOI: 10.1063/1.4899054.
- [3] Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, James Friend, Shogo Miyata and Jun Komotori, “Efficient subculture process for adherent cells by selective collection using cultivation substrate vibration,” *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 2016/05/03 [in press], DOI: 10.1109/TBME.2016.2567647.

国際会議

- [1] ○Yuta Kurashina, Shogo Miyata, Jun Komotori and Tadayoshi Koyama, “Proliferation and adhesion of L929 fibroblasts on surfaces with different microtopographies,” MRS Fall Meeting & Exhibit, Boston, US, 2013/12/06, Oral presentation.
- [2] ○Yuta Kurashina, Kenjiro Takemura, Shogo Miyata, Jun Komotori and Tadayoshi Koyama, “Cytodetachment technique using ultrasonic vibration,” EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference, Oahu, US, 2014/12/08, Poster presentation.
- [3] ○Yuta Kurashina, Iza Husna Mohamad Hashim, Kenjiro Takemura, Shogo Miyata, Jun Komotori and Tadayoshi Koyama, “A novel cell collection method using natural vibration and temperature modulation of cultivation base,” ASME 2015 International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Houston, US, 2015/11/17, Oral presentation.
- [4] ○Yuta Kurashina, Iza Husna Mohamad Hashim, Kenjiro Takemura, Shogo Miyata and Jun Komotori, “Resonance vibration and temperature modulation enhances cell detachment from cultivation substrate,” Society-Wide Micro and Nano technology Forum at ASME 2015

International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Houston, US, 2015/11/17, Poster presentation.

国内会議

- [1] ○倉科佑太, 新井謙正, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, “軟骨細胞の増殖性に及ぼす金属製培養基材の表面性状の影響,” 第 60 期日本材料学会関東支部学生研究交流会, 横浜, 2011/10/15, ポスター発表.
- [2] ○倉科佑太, 新井謙正, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “異なる凹凸を有するステンレス表面における軟骨細胞の増殖性と接着挙動,” 第 61 期日本材料学会学術講演会, 岡山, 2012/05/26, 口頭発表.
- [3] ○浜野拓巳, 倉科佑太, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “軟骨細胞の増殖性と回収効率に及ぼす温度刺激の影響,” 第 61 期日本材料学会関東支部学生研究交流会, 東京, 2012/10/13, ポスター発表.
- [4] ○倉科佑太, 谷口健介, 竹村研治郎, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “超音波振動刺激を利用したウシ関節由来軟骨細胞の回収方法の検討,” 第 12 回日本再生医療学会総会, 神奈川, 2013/03/21, ポスター発表.
- [5] ○浜野拓巳, 倉科佑太, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “仔ウシ由来関節軟骨細胞の増殖性と回収効率に及ぼす温度刺激の影響,” 第 62 期日本材料学会学術講演会, 2013/05/19, 口頭発表.
- [6] ○倉科佑太, 谷口健介, 竹村研治郎, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “金属製超音波振動培養器上で増殖したウシ由来軟骨細胞の sGAG 産生能力の評価,” 日本材料学会平成 24 年度学術講演大会, 東京, 2013/06/08, 口頭発表.
- [7] ○浜野拓巳, 倉科佑太, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “金属表面で培養した仔ウシ由来軟骨細胞の回収効率に及ぼす温度刺激の影響,” 第 63 期日本材料学会学術講演会, 福岡, 2014/05/18, 口頭発表.
- [8] ○岩永健太郎, 浜野拓巳, 倉科佑太, Iza Husna M.Hashim, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “温度刺激により金属表面から回収した細胞の増殖性,” 日本金属学会第 156 回春期講演大会, 東京, 2015/03/20, 口頭発表.
- [9] 倉科佑太, ○今城哉裕, 竹村研治郎, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, “面外振動モードを励振可能な培養器による連続的な細胞培養,” 日本機械学会 2015 年度年次大会, 北海道, 2015/09/15, 口頭発表.

- [10] ○岩永健太郎, 倉科佑太, 宮田昌吾, 竹村研治郎, 小茂鳥潤, “SUS316L 表面で培養した ATDC5 細胞の軟骨分化能の評価,” 第 65 期日本材料学会学術講演会, 富山, 2016/05/29, 口頭発表.

特許

- [1] 倉科佑太, 新井謙正, 宮田昌悟, 竹村研治郎, 小茂鳥潤, 小山尹誉, 細胞培養器, 特開 2013-255483.
- [2] 濱野拓巳, 倉科佑太, 宮田昌悟, 小茂鳥潤, 小山尹誉, 細胞回収方法, 特開 2015-216868.

受賞

- [1] 倉科佑太, 学術講演会優秀講演賞, 日本材料学会 (第 61 期日本材料学会学術講演会), 2012/05/26.
- [2] 倉科佑太, 学術講演大会若手奨励賞, 日本材料学会 (日本材料学会平成 24 年度学術講演大会), 2013/06/08.
- [3] Yuta Kurashina, Iza Husna M. Hashim, Kenjiro Takemura, Shogo Miyata and Jun Komotori, Best paper award, Society-Wide Micro and Nano technolog Forum (2015 ASME International Mechanical Engineering Congress & Exposition), 2015/11/17.

解説論文

- [1] 小茂鳥潤, 倉科佑太, 村井一恵, 宮田昌悟, 竹村研治郎, 小山尹誉, “微粒子ピーニングによる細胞適合表面の創製とその応用,” 砥粒加工学会, vol. 57, no.6, pp. 349-352, 2013.

その他の学術論文

- [1] Masayoshi Mizutani, Ryo Honda, Yuta Kurashina, Jun Komotori and Hitoshi Ohmori, “Improved cytocompatibility of nanosecond-pulsed laser-treated commercially pure Ti surfaces,” *Int. J. Autom. Tech.*, vol. 8, no. 1, pp. 102-109, 2013.
- [2] 小林紀穂, 倉科佑太, 竹村研治郎, 横田眞一, 枝村一弥, “電界共役流体を用いた Droplet μ TAS のための液滴混合デバイスの開発,” *日本機械学会論文集*, vol. 80, no. 819, pp. 1-11, 2014, DOI: 10.1299/transjsme.2014mn0332.

参考文献

- [1] H. G. Chambers, “Osteochondral autologous transplantation was more effective than microfracture for osteochondritis dissecans in children younger than eighteen years,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 92, no. 10, p. 1998, 2010.
- [2] L. A. Fortier, H. G. Potter, E. J. Rickey, L. V. Schnabel, L. F. Foo, L. R. Chong, T. Stokol, J. Cheetham, and A. J. Nixon, “Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 92, no. 10, pp. 1927-1937, 2010.
- [3] S.-W. Kang, L. P. Bada, C.-S. Kang, J.-S. Lee, C.-H. Kim, J.-H. Park, and B.-S. Kim, “Articular cartilage regeneration with microfracture and hyaluronic acid,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 30, no. 3, pp. 435-439, 2007.
- [4] Langer, R., and Vacanti, J. P., “Tissue Engineering,” *Science*, vol. 260, no. 5, pp. 920-926, 1993.
- [5] N. O'Connor, J. Mulliken, S. Banks-Schlegel, O. Kehinde, and H. Green, 1981, “Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells,” *The Lancet*, vol. 317, no. 8211, pp. 75-78, 1981.
- [6] G. G. Gallico, N. E. ÓConnor, C. C. Compton, O. Kehinde, and H. Green, “Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 311, no. 7, pp. 448-451, 1984.
- [7] D. M. Supp, and S. T. Boyce, “Engineered skin substitutes: practices and potentials,” *Clin. Dermatol.*, vol. 23, no. 4, pp. 403-412, 2005.
- [8] 井家益和, 小澤洋介, “自家培養表皮：再生医療の産業化（基礎と臨床）,” *日本薬理学雑誌*, vol. 137, no. 3, pp. 150-153, 2011.
- [9] M. Brittberg, A. Lindahl, A. Nilsson, C. Ohlsson, O. Isaksson, and L. Peterson, “Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 14, pp. 889-895, 1994.
- [10] K. Takahashi, and S. Yamanaka, “Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors,” *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663-676, 2006.

- [11] J. Yu, M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto, J. Antosiewicz-Bourget, J. L. Frane, S. Tian, J. Nie, G. A. Jonsdottir, V. Ruotti, R. Stewart, I. I. Slukvin, and J. A. Thomson, “Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells,” *Science*, vol. 318, no. 5858, pp. 1917-1920, 2007.
- [12] K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, and S. Yamanaka, “Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors,” *Cell*, vol. 131, no. 5, pp. 861-872, 2007.
- [13] 栗本康夫, “iPS細胞を用いた加齢黄斑変性治療の臨床研究,” *日本白内障学会誌*, vol. 27, pp. 32-34, 2015.
- [14] 早川堯夫, 水口裕之, “ヒト iPS 細胞の再生医療および創薬研究への応用の現状と展望,” *BRAIN and NERVE*, vol. 64, no. 1, pp. 47-57, 2012.
- [15] 辻川元一, “角膜の再生医療,” *臨眼*, vol. 68, no. 7, pp. 929-934, 2014.
- [16] 藤田淳, 福田恵一, “iPS細胞を用いた心臓再生医療の現状と課題,” *医学のあゆみ*, vol. 251, no. 3, pp. 250-255, 2014.
- [17] 松浦勝久, “多能性幹細胞の3次元大量培養システム,” *生物工学会誌*, vol. 92, no. 9, pp. 483-486, 2014.
- [18] T. G. Otsuji, J. Bin, A. Yoshimura, M. Tomura, D. Tateyama, I. Minami, Y. Yoshikawa, K. Aiba, J. E. Heuser, T. Nishino, K. Hasegawa, and N. Nakatsuji, “A 3D sphere culture system containing functional polymers for large-scale human pluripotent stem cell production,” *Stem Cell Rep.*, vol. 2, no. 5, pp. 734-745, 2014.
- [19] S. Tohyama, J. Fujita, T. Hishiki, T. Matsuura, F. Hattori, R. Ohno, H. Kanazawa, T. Seki, K. Nakajima, Y. Kishino, M. Okada, A. Hirano, T. Kuroda, S. Yasuda, Y. Sato, S. Yuasa, M. Sano, M. Suematsu, and K. Fukuda, “Glutamine oxidation is indispensable for survival of human pluripotent stem cells,” *Cell Metab.*, vol. 23, pp. 663-674, 2016.
- [20] 株式会社シード・プランニング, “平成24年度 中小企業支援調査（再生医療の実用化・産業化に係る調査事務等）,” pp. 1-90, 2013.
- [21] R. I. Freshney, “Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications”, Wiley-Blackwell (Hoboken, N. J.), 2010.
- [22] H. Lodich, “分子細胞生物学 第5版,” pp. 169-211, 2005.
- [23] P. Kanchanawong, G. Shtengel, A. M. Pasapera, E. B. Ramko, M. W. Davidson, H. F. Hess, and C. M. Waterman, “Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions,” *Nature*, vol. 468, no. 7323, pp. 580-584, 2010.

- [24] 木岡紀幸, “細胞増殖シグナルの足場依存性に関与する新規細胞骨格タンパク質に関する研究,” *日本農芸化学会誌*, vol. 77, no. 10, pp. 968-973, 2003.
- [25] P. Galéra, F. Rédini, D. Vivien, J. Bonaventure, H. Penfornis, G. Loyau, and J. P. Pujol, “Effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) on matrix synthesis by monolayer cultures of rabbit articular chondrocytes during the dedifferentiation process,” *Exp. Cell Res.*, vol. 200, no. 2, pp. 379-392, 1992.
- [26] R. G. Harrison, M. J. Greenman, and F. P. Mall, “Observations of the living developing nerve fiber,” *Anat. Rec.*, vol. 1, no. 5, pp. 116-128, 1907.
- [27] J. Maienschein, “Ross Granville Harrison (1870-1959) and perspectives on regeneration,” *J. Exp. Zool.*, vol. 314B, no. 8, pp. 607-615, 2010.
- [28] A. S. Curtis, J. V. Forrester, C. McInnes, and F. Lawrie, “Adhesion of cells to polystyrene surfaces,” *J. Cell Biol.*, vol. 97, no. 5, pt. 1, pp. 1500-1506, 1983.
- [29] 佐藤温重, 石川達也, 桜井靖久, 中村晃忠, “バイオマテリアルと生体—副作用と安全性,” 中山書店, pp. 12-19, 1998.
- [30] R. Adell, U. Lekholm, B. Rockler, P.-I. Brånemark, J. Lindhe, B. Eriksson, and L. Sbordone, “Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium,” *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, vol. 15, no. 1, pp. 39-52, 1986.
- [31] 板橋勇人, 宮崎隆, 藤森伸也, 李元植, 1995, “異なった微小表面形状を有するチタン表面上での骨芽細胞様細胞の初期動態,” *歯科材料・器械*, vol. 14, no. 1, pp. 136-141, 1995.
- [32] M. Jayaraman, U. Meyer, M. Bühner, U. Joos, and H.-P. Wiesmann, “Influence of titanium surfaces on attachment of osteoblast-like cells in vitro,” *Biomaterials*, vol. 25, no. 4, pp. 625-631, 2004.
- [33] W.-C. Chen, Y.-S. Chen, C.-L. Ko, Y. Lin, T.-H. Kuo, and H.-N. Kuo, “Interaction of progenitor bone cells with different surface modifications of titanium implant,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 37, pp. 305-313, 2014.
- [34] R. A. Gittens, T. McLachlan, R. Olivares-Navarrete, Y. Cai, S. Berner, R. Tannenbaum, Z. Schwartz, K. H. Sandhage, and B. D. Boyan, “The effects of combined micron-/submicron-scale surface roughness and nanoscale features on cell proliferation and differentiation,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 13, pp. 3395-3403, 2011.
- [35] 長井篤, 宮田昌悟, 齊藤万里雄, 小茂鳥潤, 小尾晋之介, 難波洋司, 小山尹誉, “L929 線維芽細胞の増殖性と接着性に及ぼす基材表面の微細凹凸形状の影響,” *日本機械学会論文集A編*, vol. 77, no. 775, pp. 544-551, 2011.

- [36] 亀山雄高, 小茂鳥潤, 山田健人, “微粒子ピーニング処理を用いた生体親和表面の創製,” *砥粒加工学会誌*, vol. 49, no. 2, pp. 86-89, 2005.
- [37] 小茂鳥潤, 亀山高雄, “FPB処理の医療用途への応用,” *精密工学会誌*, vol. 72, no. 9, pp. 1083-1086, 2006.
- [38] S. Kikuchi, Y. Kameyama, M. Mizutani, and J. Komotori, “Effects of fine particle peening on oxidation behavior of nickel-titanium shape memory alloy,” *Mater. Trans.*, vol. 55, no. 1, pp. 176-181, 2014.
- [39] K. Ohnuma, A. Fujiki, K. Yanagihara, S. Tachikawa, Y. Hayashi, Y. Ito, Y. Onuma, T. Chan, T. Michiue, M. K. Furue, and M. Asashima, “Enzyme-free passage of human pluripotent stem cells by controlling divalent cations,” *Sci. Rep.*, vol. 4, p. 4646, 2014.
- [40] 赤土和也, 山崎健一, 中尾誠, 寺田堂彦, 藤里俊哉, 吉浦昌彦, 筒井博司, “骨格筋培養のための機械刺激負荷に関する研究,” *生体医工学*, vol. 47, no. 2, pp. 231-236, 2009.
- [41] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenon, D. K., and B. I. Shraiman, “Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition,” *Proc Natl Acad Sci USA*, vol. 109, no. 3, pp. 739-744, 2012.
- [42] R. Umegaki, M. Kino-oka, and M. Taya, “Assessment of cell detachment and growth potential of human keratinocyte based on observed changes in individual cell area during trypsinization,” *Biochem. Eng. J.*, vol. 17, no. 1, pp. 49-55, 2004.
- [43] Y. Wu, J. Wu, D. Y. Lee, A. Yee, L. Cao, Y. Zhang, C. Kiani, and B. B. Yang, “Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis,” *Matrix Biol.*, vol. 24, no. 1, pp. 3-13, 2005.
- [44] K. T. Piercy, R. L. Donnell, S. S. Kirkpatrick, B. L. Mundy, S. L. Stevens, M. B. Freeman, and M. H. Goldman, “Effect of harvesting and sorting on β -1 integrin in canine microvascular cells,” *J. Surg. Res.*, vol. 100, no. 2, pp. 211-216, 2001.
- [45] R. Gräbner, U. Till, and R. Heller, “Flow cytometric determination of E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1, and intercellular cell adhesion molecule-1 in formaldehyde-fixed endothelial cell monolayers,” *Cytometry*, vol. 40, no. 3, pp. 238-244, 2000.
- [46] J. P. Revel, P. Hoch, and D. Ho, “Adhesion of culture cells to their substratum,” *Exp. Cell Res.*, vol. 84, no. 1, pp. 207-218, 1974.
- [47] H. Hirai, R. Umegaki, M. Kino-oka, and M. Taya, “Characterization of cellular motions through direct observation of individual cells at early stage in anchorage-dependent culture,” *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 94, no. 4, pp. 351-356, 2001.

- [48] A. H. Reshak, M. M. Shahimin, and F. Buang, "Progress in biophysics and molecular biology," *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 113, no. 2, pp. 295-298, 2013.
- [49] K. Yonenaga, S. Nishizawa, Y. Fujihara, Y. Asawa, K. Sanshiro, S. Nagata, T. Takato, and K. Hoshi, "The optimal conditions of chondrocyte isolation and its seeding in the preparation for cartilage tissue engineering," *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 16, no. 6, pp. 1461-1469, 2010.
- [50] T. Kloskowski, M. Uzarska, N. Gurtowska, J. Olkowska, R. Joachimiak, A. Bajek, M. Gagat, A. Grzanka, M. Bodnar, A. Marszałek, and T. Drewa, T., "How to isolate urothelial cells? Comparison of four different methods and literature review," *Hum. Cell*, vol. 27, no. 2, pp. 85-93, 2013.
- [51] H. Green, O. Kehinde, and J. Thomas, "Growth of cultured human epidermal-cells into multiple epithelia suitable for grafting," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 76, no. 11, pp. 5665-5668, 1979.
- [52] A. Ito, Y. Takizawa, M. Shinkai, H. Honda, K. Hata, M. Ueda, N. Kuno, A. Itakura, and T. Kobayashi, "Proliferation and stratification of keratinocyte on cultured amniotic epithelial cells for tissue engineering," *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 95, no. 6, pp. 589-593, 2003.
- [53] B. C. Heng, H. Liu, Z. Ge, and T. Cao, "Mechanical dissociation of human embryonic stem cell colonies by manual scraping after collagenase treatment is much more detrimental to cellular viability than is trypsinization with gentle pipetting," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 47, no. 1, pp. 33-37, 2007.
- [54] P. L. McNeil, R. F. Murphy, F. Lanni, and D. L. Taylor, "A method for incorporating macromolecules into adherent cells," *J. Cell Biol.*, vol. 98, no. 4, pp. 1556-1564, 1984.
- [55] M. A. Ward, and T. K. Georgiou, "Thermoresponsive polymers for biomedical applications," *Polymers*, vol. 3, no. 4, pp. 1215-1242, 2011.
- [56] E. L. Lee, and H. A. von Recum, "Cell culture platform with mechanical conditioning and nondamaging cellular detachment," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 93A, no. 2, pp. 411-418, 2010.
- [57] Y. Kumashiro, M. Yamato, and T. Okano, "Cell attachment-detachment control on temperature-responsive thin surfaces for novel tissue engineering," *Ann. Biomed. Eng.*, vol. 38, no. 6, pp. 1977-1988, 2010.
- [58] A. Kushida, M. Yamato, and A. Kikuchi, "Two-dimensional manipulation of differentiated Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell sheets: The noninvasive harvest from

- temperature-responsive culture dishes and transfer to other surfaces,” *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 54, pp. 37-46, 2001.
- [59] M. Kanzaki, M. Yamato, H. Hatakeyama, C. Kohno, J. Yang, T. Umemoto, A. Kikuchi, T. Okano, and T. Onuki, “Tissue engineered epithelial cell sheets for the creation of a bioartificial trachea,” *Tissue Eng.*, vol. 12, no. 5, pp. 1275-1283, 2006.
- [60] T. Kobayashi, K. Kan, K. Nishida, M. Yamato, and T. Okano, “Corneal regeneration by transplantation of corneal epithelial cell sheets fabricated with automated cell culture system in rabbit model,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 36, pp. 9010-9017, 2013.
- [61] 水谷学, 紀ノ岡正博, 清水達也, 岡野光夫, “細胞シート再生治療を支援する自動培養三次元化システム,” *日本臨床検査自動化学学会誌*, vol. 37, no. 2, pp. 1-5, 2012.
- [62] E. Nagamori, T. X. Ngo, Y. Takezawa, A. Saito, Y. Sawa, T. Shimizu, T. Okano, M. Taya, and M. Kino-oka, “Network formation through active migration of human vascular endothelial cells in a multilayered skeletal myoblast sheet,” *Biomaterials*, vol. 34, no. 3, pp. 662-668, 2013.
- [63] T. X. Ngo, E. Nagamori, T. Kikuchi, T. Shimizu, T. Okano, M. Taya, and M. Kino-oka, “Endothelial cell behavior inside myoblast sheets with different thickness,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 35, no. 7, pp. 1001-1008, 2013.
- [64] S. -H. Yoon, and M. R. K. Mofrad, “Cell adhesion and detachment on gold surfaces modified with a thiol-functionalized RGD peptide,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 30, pp. 7286-7296, 2011.
- [65] T. Kakegawa, N. Mochizuki, N. Sadr, H. Suzuki, and J. Fukuda, “Cell-adhesive and cell-repulsive zwitterionic oligopeptides for micropatterning and rapid electrochemical detachment of cells,” *Tissue Eng. Part A*, vol. 19, no. 1-2, pp. 290-298, 2013.
- [66] T. Kageyama, T. Kakegawa, T. Osaki, J. Enomoto, T. Ito, T. Nittami, and J. Fukuda, “Rapid engineering of endothelial cell-lined vascular-like structures in in situ crosslinkable hydrogels,” *Biofabrication*, vol. 6, no. 025006, pp. 1-11, 2014.
- [67] R. Thomas, A. Chandra, P. Hourd, and D. Williams, “Cell culture automation and quality engineering: A necessary partnership to develop optimized manufacturing processes for cell-based therapies,” *J. Lab. Autom.*, vol. 13, no. 3, pp. 152-158, 2008.
- [68] 中嶋勝己, 金澤秀和, 高木睦, 脇谷滋之, 稲木誠, “接着性細胞の自動培養装置の開発,” *Inflamm. Regen.*, vol. 29, no. 2, pp. 131-134, 2009.
- [69] É. Török, J.-M. Pollok, P. X. Ma, C. Vogel, M. Dandri, J. Petersen, M. R. Burda, P. M. Kaufmann, D. Kluth, and X. Rogiers, “Hepatic tissue engineering on 3-dimensional

- biodegradable polymers within a pulsatile flow bioreactor,” *Dig. Surg.*, vol. 18, no. 3, pp. 196-203, 2001.
- [70] G. J. Housler, T. Miki, E. Schmelzer, C. Pekar, X. Zhang, L. Kang, V. Voskianarian-Berse, S. Abbot, K. Zeilinger, and J. C. Gerlach, “Compartmental hollow fiber capillary membrane-based bioreactor technology for in vitroStudies on red blood cell lineage direction of hematopoietic stem cells,” *Tissue Eng. Part C Methods*, vol. 18, no. 2, pp. 133-142, 2012.
- [71] J. Bardy, A. K. Chen, Y. M. Lim, S. Wu, S. Wei, H. Weiping, K. Chan, S. Reuveny, and S. K.W. Oh, “Microcarrier suspension cultures for high-density expansion and differentiation of human pluripotent stem cells to neural progenitor cells,” *Tissue Eng Part C*, vol. 19, no. 2, pp. 166-180, 2013.
- [72] Y. Haraguchi, K. Matsuura, T. Shimizu, M. Yamato and T. Okano, “Simple suspension culture system of human iPS cells maintaining their pluripotency for cardiac cell sheet engineering,” *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, vol. 9, pp. 1363-1375, 2013.
- [73] R.-Z. Lin, and H.-Y. Chang, “Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research,” *Biotechnol. J.*, vol. 3, no. 9-10, pp. 1172-1184, 2008.
- [74] M. Q. Deng, and D. O. Cliver, “Rapid DNA extraction methods and new primers for randomly amplified polymorphic DNA analysis of *Giardia duodenalis*,” *J. Microbiol. Methods*, vol. 37, no. 2, pp. 193-200, 1999.
- [75] D. Carugo, D. N. Ankrett, P. Glynne-Jones, L. Capretto, R. J. Boltryk, X. Zhang, P. A. Townsend, and M. Hill, “Contrast agent-free sonoporation: The use of an ultrasonic standing wave microfluidic system for the delivery of pharmaceutical agents,” *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 044108, pp. 1-15, 2011.
- [76] L. Meng, F. Cai, P. Jiang, Z. Deng, F. Li, L. Niu, Y. Chen, J. Wu, and H. Zheng, “On-chip targeted single cell sonoporation with microbubble destruction excited by surface acoustic waves,” *Appl. Phys. Lett.*, vol. 104, no. 073701, pp. 1-5, 2014.
- [77] J. D. Heckman, J. P. Ryaby, J. McCabe, J. J. Frey, and R. F. Kilcoyne, “Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 76, no. 1, pp. 26-34, 1994.
- [78] T. K. Kristiansen, J. P. Ryaby, J. McCabe, J. J. Frey, and L. R. Roe, “Accelerated healing of distal radial fractures with the use of specific, low-intensity ultrasound; A multicenter, prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study,” *J. Bone Joint Surg. Am.*, vol. 79, no. 7, pp. 961-973, 1997.

- [79] G. Guo, L. Lu, H. Ji, Y. Ma, R. Dong, J. Tu, X. Guo, Y. Qiu, J. Wu, and D. Zhang, "Low intensity pulse ultrasound stimulate chondrocytes growth in a 3-D alginate scaffold through improved porosity and permeability," *Ultrasonics*, vol. 58, pp. 43-52, 2015.
- [80] 白石俊彦, 森下信, 幸光範子, 竹内良平, 斎藤知行, 高垣裕子, "3次元培養軟骨細胞に対する超音波刺激の影響," *日本機械学会*, vol. 7, no. 8, 2007.
- [81] S.-H. Chen, C.-Y. Chiu, and S.-H. Wang, "The growth of osteoblasts stimulated by various time duration of low intensity pulsed ultrasounds," *IEEE Int. Ultrason. Symp.*, pp. 365-368, 2009.
- [82] S.-G. Yan, L.-Y. Huang, and X.-Z. Cai, "Low-intensity pulsed ultrasound: A potential non-invasive therapy for femoral head osteonecrosis," *Med. Hypotheses*, vol. 76, no. 1, pp. 4-7, 2011.
- [83] 牛田多加志, 生医療における3要素+1要素, *日本機械学会誌*, vol. 117, no. 1142, pp. 12-15, 2014.
- [84] A. L. Bernassau, C.-K. Ong, Y. Ma, P. G. A. MacPherson, C. R. P. Courtney, M. Riehle, B. W. Drinkwater, and D. R. S. Cumming, "Two-dimensional manipulation of micro particles by acoustic radiation pressure in a heptagon cell," *IEEE Trans Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 58, no. 10, pp. 2132-2138, 2011.
- [85] F. Gesellchen, A. L. Bernassau, T. Déjardin, D. R. S. Cumming, and M. O. Riehle, "Cell patterning with a heptagon acoustic tweezer-application in neurite guidance," *Lab Chip*, vol. 14, pp. 2266-2275, 2014.
- [86] M. Hoyos, and A. Castro, "Controlling the acoustic streaming by pulsed ultrasounds," *Ultrasonics*, vol. 53, no. 1, pp. 70-76, 2013.
- [87] S. A. Seah, B. W. Drinkwater, T. Carter, R. Malkin, and S. Subramanian, "Dexterous ultrasonic levitation of millimeter-sized objects in air," *IEEE Trans. Ultrason., Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 61, no. 7, pp. 1233-1236, 2014.
- [88] X. Shi, R. W. Martin, S. Vaezy, and L. A. Crum, "Quantitative investigation of acoustic streaming in blood," *J. Acoust. Soc. Am.*, vol. 111, no. 2, pp. 1110-1121, 2002.
- [89] J. Lee, J. S. Jeong, and K. K. Shung, "Microfluidic acoustic trapping force and stiffness measurement using viscous drag effect," *Ultrasonics*, vol. 53, no. 1, pp. 249-254, 2013.
- [90] H. Li, J. R. Friend, and L. Y. Yeo, "Surface acoustic wave concentration of particle and bioparticle suspensions," *Biomed Microdevices*, vol. 9, no. 5, pp. 647-656, 2007.

- [91] R. Shilton, M. K. Tan, L. Y. Yeo, and J. R. Friend, "Particle concentration and mixing in microdroplets driven by focused surface acoustic waves," *J. Appl. Phys.*, vol. 104, no. 014910, pp. 1-9, 2008.
- [92] P. R. Rogers, J. R. Friend, and L. Y. Yeo, "Exploitation of surface acoustic waves to drive size-dependent microparticle concentration within a droplet," *Lab Chip*, vol. 10, no. 21, pp. 2979-2985, 2010.
- [93] J. Blamey, L. Y. Yeo, and J. R. Friend, "Microscale capillary wave turbulence excited by high frequency vibration," *Langmuir*, vol. 29, no. 11, pp. 3835-3845, 2013.
- [94] M. Alvarez, J. R. Friend, and L. Y. Yeo, "Surface vibration induced spatial ordering of periodic polymer patterns on a substrate," *Langmuir*, vol. 24, no. 19, pp. 10629-10632, 2008.
- [95] H. Li, J. R. Friend, and L. Y. Yeo, "Microfluidic colloidal island formation and erasure induced by surface acoustic wave radiation," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 101, no. 084502, pp. 1-4, 2008.
- [96] M. Bok, H. Li, L. Y. Yeo, and J. R. Friend, "The dynamics of surface acoustic wave-driven scaffold cell seeding," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 103, no. 2, pp. 387-401, 2009.
- [97] O. Manneberg, J. Svennebring, H. M. Hertz, and M. Wiklund, 2008, "Wedge transducer design for two-dimensional ultrasonic manipulation in a microfluidic chip," *J. Micromech. Microeng.*, vol. 18, no. 095025, pp. 1-9, 2008.
- [98] B. Vanherberghen, O. Manneberg, A. Christakou, T. Frisk, M. Ohlin, H. M. Hertz, B. Önfelt, and M. Wiklund, "Ultrasound-controlled cell aggregation in a multi-well chip," *Lab Chip*, vol. 10, no. 20, pp. 2727-2732, 2010.
- [99] A. Abdal-hay, M.-G. Hwang, and J. K. Lim, 2012, "In vitro bioactivity of titanium implants coated with bicomponent hybrid biodegradable polymers," *J. Sol-Gel Sci. Technol.*, vol. 64, no. 3, pp. 756-764, 2012.
- [100] M. H. Lee, J. H. Kang, and S. W. Lee, "The significance of differential expression of genes and proteins in human primary cells caused by microgrooved biomaterial substrata," *Biomaterials*, vol. 33, no. 11, pp. 3216-3234, 2012.
- [101] T. P. Kunzler, T. Drobek, M. Schuler, and N. D. Spencer, "Systematic study of osteoblast and fibroblast response to roughness by means of surface-morphology gradients," *Biomaterials*, vol. 28, no. 13, pp. 2175-2182, 2007.

- [102] L. Ramaglia, L. Postiglione, G. D. Spigna, G. Capece, S. Salzano, and G. Rossi, "Sandblasted-acid-etched titanium surface influences in vitro the biological behavior of SaOS-2 human osteoblast-like cells," *Dent. Mater. J.*, vol. 30, no. 2, pp. 183-192, 2011.
- [103] H. F. Li, Y. B. Wang, Y. F. Zheng, and J. P. Lin, "Osteoblast response on Ti- and Zr-based bulk metallic glass surfaces after sand blasting modification," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 100, no. 7, pp. 1721-1728, 2012.
- [104] T. Inoue, and H. Osatake, "A new drying method of biological specimens for scanning electron microscopy: the t-butyl alcohol freeze-drying method," *Arch. Histol. Cytol.*, vol. 51, no. 1, pp. 53-59, 1988.
- [105] M. Abercrombie, and J. E. Heaysman, "Observations on the social behaviour of cells in tissue culture. II. Monolayering of fibroblasts.," *Exp. Cell. Res.*, vol. 6, no. 2, pp. 293-306, 1954.
- [106] L. Yang, V. Chinthapenta, Q. Li, D. Stout, A. Liang, B. W. Sheldon, and T. J. Webster, "Understanding osteoblast responses to stiff nanotopographies through experiments and computational simulations," *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 97, no. 4, pp. 375-382, 2011.
- [107] 安達安泰, 河東万智子, 佐藤克也, 田川雅人, "細胞接着マイクロパターンニングとアクチン細胞骨格の配向制御: 原子ビームを用いた基板表面改質の試み," *日本結晶成長学会誌*, vol. 31, no. 2, pp. 78-82, 2004.
- [108] R. J. Wieser, D. Renauer, A. Schäfer, R. Heck, R. Engel, S. Schütz, and F. Oesch, "Growth control in mammalian cells by cell-cell contacts," *Environ. Health Perspect.*, vol. 88, pp. 251-253, 1990.
- [109] A. Puliafito, L. Hufnagel, P. Neveu, S. Streichan, A. Sigal, D. K. Fygenson, and B. I. Shraiman, "Collective and single cell behavior in epithelial contact inhibition," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 109, no. 3, pp. 739-744, 2012.
- [110] Y. Lee, L. V. McIntire, and K. Zygorakis, "Analysis of endothelial cell locomotion: Differential effects of motility and contact inhibition," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 43, no. 7, pp. 622-634, 1994.
- [111] M. Fiore, and F. Degrassi, 1999, "Dimethyl sulfoxide restores contact inhibition-induced growth arrest and inhibits cell density-dependent apoptosis in hamster cells," *Exp. Cell Res.*, vol. 251, no. 1, pp. 102-110, 1999.
- [112] M. N. Rylander, K. R. Diller, S. Wang, and S. J. Aggarwal, "Correlation of HSP70 expression and cell viability following thermal stimulation of bovine aortic endothelial cells," *J. Biomech. Eng.*, vol. 127, pp. 751-757, 2005.

- [113] I. Machida Sano, Y. Matsuda, and H. Namiki, "A novel harvesting method for cultured cells using iron-cross-linked alginate films as culture substrates," *Biotechnol. Appl. Biochem.*, vol. 55, pp. 1-8, 2010.
- [114] F. Rico, C. Chu, M. H. Abdulreda, Y. Qin, and V. T. Moy, "Temperature modulation of integrin-mediated cell adhesion," *Biophys. J.*, vol. 99, no. 5, pp. 1387-1396, 2010.
- [115] G. Sagvolden, I. Giaever, E. O. Pettersen, and J. Feder, "Cell adhesion force microscopy," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 96, pp. 471-476, 1999.
- [116] R. L. Juliano, and E. Gagalang, "The adhesion of Chinese hamster cells. I. Effects of temperature, metabolic inhibitors and proteolytic dissection of cell surface macromolecules," *J. Cell Physiol.*, vol. 92, pp. 209-220, 1977.
- [117] S. D. Marlin, T. A. Springer, "Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)," *Cell*, vol. 51, no. 5, pp. 813-819, 1987.
- [118] M. F. Underhill, and C. M. Smales, "The cold-shock response in mammalian cells: investigating the HeLa cell cold-shock proteome," *Cytotechnology*, vol. 53, pp. 47-53, 2007.
- [119] H. Kaufmann, X. Mazur, M. Fussenegger, and J. E. Bailey, "Influence of low temperature on productivity, proteome and protein phosphorylation of CHO cells," *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 63, no. 5, pp. 573-582, 1999.