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

2019年5月

今城 哉裕

主 論 文 要 旨

No.1

報告番号 甲上 第 号 氏 名 今城 哉裕

主論文題名:

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

(内容の要旨)

近年、培養細胞を用いた医療が注目されており、細胞の適切な培養、回収手法が求められている。細胞はそれぞれに適した培養法があり、培養面上で目的に応じた形状にパターニングする必要や培養した細胞を一枚のシート状に回収する必要がある。現在、特殊な培養容器や培養環境を適用することでこれらの操作を行っている。しかし、医療への応用を鑑みると汎用培養器における理想的環境下での培養が理想である。そこで、超音波を用いて、汎用培養器内の細胞を様々な形状にパターニングする方法、および汎用培養器から細胞をシート状に回収する方法を確立することを本研究の目的とした。

汎用培養器の直下に配置した振動子から内部に超音波を伝播することで、放射力により細胞を操作する.このため、本研究では減衰が少なく培地の温度上昇の抑制が容易なkHz帯の比較的低周波の超音波を用いる.振動の分布を生成することで、放射力の小さい位置に細胞をパターニングし、培養面に均一な振動を伝播することで上方向の放射力が発生し細胞シートが剥離できると考えた.

はじめに、kHz 帯の超音波によって細胞を操作できることを確認するため、kHz 帯の固有振動を励振する薄板状の振動子を製作した. 固有振動の節の形状は振動数に応じて変化する. 振動子上に細胞を播種して、細胞パターニングを実行した. この結果、振動数に応じて節の形状が変化し、生細胞が節の形状にパターニングされること、振動数ごとにパターニングに適切な振幅が存在することが明らかになった. また、この結果から、kHz 帯の超音波による細胞操作が可能であることを確認した.

つぎに、汎用ディッシュの下方に振動子を配置し、振動子から照射される超音波をディッシュ内に伝播することで細胞のパターニングを行なった.この結果、汎用ディッシュ内において、細胞のパターニングを確認した.パターニング後の細胞の増殖性とタンパク質発現を評価し、本手法において用いた出力の超音波の非侵襲性を確認した.

最後に、汎用培養容器に培養面下方から均一な超音波を照射することで細胞シートの 剥離を実行し、剥離した細胞シートの活性を、医療応用されている従来手法で剥離した 細胞シートと比較した。この結果、提案手法によって安定的に細胞シートを生成できる ことを確認した。また、生成した細胞シートは代謝が高く、タンパク質発現や形状に異 常がないことが明らかになった。

以上のように、超音波を用いた細胞のパターニングおよび細胞シートの生成手法を確立した。

Thesis Abstract

N	^	
ΙN	u	

Registration	⊏"KOU"	□ "OTSU"	Name	Namo Chikahira Imashira	Chikahiro Imashiro
Number	No.	*Office use only		CHRAIII O III IASHII O	

Thesis Title

Cell manipulation in clinically ubiquitous culture vessels using ultrasound: Cell patterning and cell sheet detachment

Thesis Summary

Regenerative medicine and Organ-on-Chip technology attract high attention, as expects innovative cell culture and detachment methods *in vitro*. For instance, tailor-made cell patterning or cell sheet fabrication have been required. Although these operations can be performed with special vessels and environment, same operation should be done with ubiquitous culture vessels and environment further popularization. Thus, we developed a cell patterning method and cell sheet fabrication method in ubiquitous culture vessels by using ultrasonic vibration.

Ultrasonic vibration propagated from an ultrasonic transducer set beneath the culture vessels gives cells acoustic radiation pressure resulting in cell manipulation. Acoustic radiation pressure having spatial distributions may pattern cells into positions having minimum pressure, while propagation of homogeneous pressure on culture surfaces may result in detachment of cell sheets.

First, we fabricated a plate-like transducer having kHz order resonance frequencies to confirm cell manipulation by kHz order ultrasonic having relatively small attenuation. When seeding cells on the transducer exciting resonance vibrations, cells were patterned into the nodal shape of resonance vibrations. Further, this patterning has adequate vibration displacement for each resonance frequency. Possibility of cell manipulation with kHz ultrasonic was demonstrated from this result.

Second, we patterned cells in ubiquitous culture dish by propagating ultrasonic from the underneath of the dish. Even in the dish, cells can be patterned into nodal shape of resonance vibrations excited on the transducer set beneath the dish. Further, biocompatibility of the cell patterning using ultrasonic was demonstrated by estimating cell proliferation and protein expression of the patterned cells.

Finally, we fabricated cell sheets by propagating ultrasonic on culture vessel surfaces having confluent cells. Further, activity of fabricated cell sheets was compared to those fabricated by established and clinically used method, and we demonstrated the proposed method efficiently fabricates cell sheets having higher metabolism and normal functions.

As above, we developed cell patterning method and cell sheet fabrication method using ultrasonic vibration.