

令和元年6月15日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07081

研究課題名(和文)超音波の局所的な照射によるターゲット細胞の非接触除去

研究課題名(英文)Contactless cell detachment by local irradiation of ultrasound

研究代表者

倉科 佑太(Yuta, Kurashina)

東京工業大学・物質理工学院・助教

研究者番号：40801535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の局所的な剥離手法について超音波ホーンまたはSAWデバイスのどちらを使用するかをはじめに検討した。超音波ホーンを用いて細胞剥離を行った場合には、200 μmを下回る大きさの除去範囲での細胞除去を行うことは困難であった。一方で、SAWデバイスを用いて細胞の局所的な剥離手法について着手し、一点に超音波振動を集中することができるくし歯電極が収束するようにFocus SAWデバイスを設計・製作して、任意の位置で直径100 μm程度の大きさまで剥離領域を限定できることを確かめた。また、剥離後の細胞除去領域の周囲の細胞の生死判定を行ったが、残存する細胞を損傷せずに剥離できることが確かめられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の細胞剥離技術は、化学的な薬剤を使用せずに物理的に細胞を剥離することができる。さらに周囲の細胞への影響もほとんどないことから、再生医療や創薬研究のための細胞培養の際に、他の細胞に害を与えずに安全に不要な細胞の除去に用いることができる。また、本研究は超音波振動を極小領域に照射する方法を複数検討し、最も適した方法としてFocus SAWデバイスを提示した。これらの知見は振動工学の生物への応用の可能性を示すことに貢献した。

研究成果の概要(英文)：We first selected whether to use an ultrasonic horn or a SAW device for the local detachment of cells. When cell detachment was performed with the ultrasonic horn, it was difficult to remove cell within a removal area of less than 200 μm. On the other hand, we fabricated a local detachment method with a SAW device. In order to focus on one point, we designed and manufactured Focus SAW device with the concentrated IDT fingers. And the removal area was able to limit to a size of about 100 μm at the position. In addition, the viability of cells around the cell removal area after detachment was evaluated, but it was confirmed that the remaining cells were cultured without damage.

研究分野：バイオメカニカルエンジニアリング

キーワード：超音波 細胞剥離 細胞培養 再生医療 表面弾性波

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、ヒト iPS 細胞が樹立され、再生医療分野において培養細胞を用いた治療法が高い注目を集めている。たとえば、2014 年には世界に先駆けて理化学研究所により 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が行われた。本治療は、術後 1 年後も経過が良好であり、2017 年には他家 iPS 細胞を用いるなど、治療法が確立されつつある。iPS 細胞の利用は網膜のみに留まらず、心臓移植に変わる重症心不全患者の根治療法に用いられている。その一例として、再生心筋細胞移植の治療の確立が期待されている。しかし、網膜治療とは異なり、再生心筋細胞移植の臨床試験は未だ行われていない。この最も大きな要因として、

体内の臓器である心筋は、細胞が腫瘍化や不整脈を引き起こした際、患者の死に直結してしまうことから、極めて安全な細胞のみしか使用できないためである。

腫瘍化や不整脈を引き起こす原因は、分化誘導後に残存する未分化の iPS 細胞や心筋細胞以外に分化した細胞である(図 1a)。この問題を解決するために、ラベリングした iPS 細胞をフローサイトメトリーで除去する方法や iPS 細胞に必須の栄養分を抜いた培地で iPS 細胞のみを死滅させる方法が開発されている。しかし、これらの方法では試薬を投与する必要があるが、特定の細胞(心筋細胞)しか残存させることができない。また、除去する細胞に遠赤外線レーザーを照射する方法も報告されているが、死滅した細胞は基材に残存し、除去することはできない(図 1b)。すなわち、試薬を投与する必要なく、多様な細胞種に対応できるターゲット細胞を除去できるシステムの実現が期待されている。

一方、申請者は新たな医療の発展・普及に貢献すべく、超音波技術を用いた細胞培養技術の開発を行ってきた。これまでに、金属基材上で接着性細胞を培養し、基材の固有振動(超音波振動)を用いて効率的に細胞を基材から剥離する研究や、超音波をウェルプレートの底面に照射し、発生した音響流を用いて細胞塊を生成する研究を報告してきた。

以上の iPS 細胞による治療法に関する背景と細胞培養における超音波アクチュエーション技術の可能性を鑑み、申請者は超音波技術を用いて、ターゲットとする細胞を効率的に除去できる細胞培養システムを着想し、本研究を開始した(図 1c)。

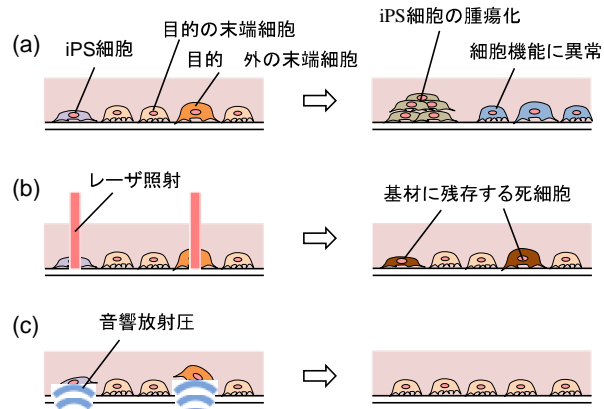


図1 末端細胞に分化後の処置の有無による細胞の挙動。(a)未処理状態では、iPS細胞が腫瘍化し、主要な末端細胞が細胞機能に異常をもたらす。(b)遠赤外線レーザーにより除去した場合には、基材に死細胞が残存し、末端細胞に悪影響を及ぼす。(c)提案手法により除去した場合には、基材から死細胞が除去され、末端細胞の活性・増殖性が向上する。

2. 研究の目的

本申請課題では、以下の2項目を明らかとすることを目的とした。

(1) 照射領域を絞り、超音波を照射できる装置の製作と照射条件の選定

音響放射圧の領域を基材に接着した細胞のサイズに限定して細胞に付与するための装置を、先行研究やこれまで申請者の行った予備実験から、固有振動と表面弾性波を各々用いて2つの照射装置を製作した。これらのデバイスを個別に評価し、本申請課題の目的である細胞除去に適した照射方法と照射条件を明らかとした。

(2) ターゲットの細胞を除去後、周囲の細胞に及ぼす影響の検討

ターゲットとした細胞を除去した後に、ターゲットの細胞の周囲の細胞を観察し、それらの細胞の損傷や活性を評価することで提案手法が周囲の細胞に及ぼす影響について明らかにした。

以上の2点を明らかにすることで、再生医療などの先端治療を行う際に大きな問題となる特定の細胞を除去する新たなシステムを確立することができる。

3. 研究の方法

超音波を局所的に培養ディッシュの底面から照射することで、ターゲットの細胞を除去する。このため以下の4項目を段階的に達成した。

(1) 局所的な超音波を照射可能な超音波ホーンの開発

- (2) ターゲット細胞除去後に周囲に残存する細胞の評価（超音波ホーン）
- (3) 領域を限定して超音波を照射できる SAW（表面弾性波）デバイスの開発
- (4) ターゲット細胞除去後に周囲に残存する細胞の評価（SAW デバイス）

上記の(1)~(4)の項目を検討し、超音波ホーンまたは SAW デバイスのうち、ターゲットの細胞剥離に適する方法を選択した。

【平成 29 年度】

- (1) 局所的な超音波を照射可能な超音波ホーンの開発

研究目的に示したように、申請課題では超音波の照射により生じる音響放射圧を用いて細胞を除去した。先端を鋭利に切削加工したアルミニウム製の超音波ホーンを製作し、培養ディッシュの底面から照射した。超音波ホーンの長さは、COMSOL Multiphysics による振動解析を用いて縦方向振動する振動モードを計算、選択し、設計と製作を行った。

- (2) ターゲット細胞除去後に周囲に残存する細胞の評価（超音波ホーン）

製作した超音波ホーンを用いて、超音波を培養ディッシュの底面から照射する。この際に、照射回数、照射距離、培地量および照射位置を調節して、超音波の照射後の除去領域と周囲の細胞を評価した。実験にはモデル細胞としてマウス由来筋芽細胞（C2C12）を使用し、以下の手順により評価した。

ø35 培養ディッシュ上に C2C12 を播種し、90% コンフルエントになるまで培養し、異なる振動特性、照射条件の超音波を培養ディッシュ底面に照射し、細胞を除去した。照射後の細胞をカルセインとプロビジウムイオダイド（PI）により染色し、超音波の照射により形成される除去領域の大きさを評価し、周囲の細胞の生死を確認した。

【平成 30 年度】

- (3) 領域を限定して超音波を照射できる SAW（表面弾性波）デバイスの開発

超音波ホーンを用いると励振する周波数帯が数十 kHz であり、音響放射圧が減衰するまでの距離が長いこと、液面で反射し、予期せぬ場所に空孔ができる可能性やキャビテーションが発生する恐れがある。このため、扇形の形状の Interdigital Transducers（IDT）を LiNbO₃ の表面に形成し、表面弾性波を収束できる IDT 基盤を製作した。これを用いて SAW デバイスを製作し、数百 MHz の超音波を収束させて培養ディッシュの裏面から照射した。

- (4) ターゲット細胞除去後に周囲に残存する細胞の評価（SAW デバイス）

製作した SAW デバイスを用いて、グリセロールを介して培養ディッシュに超音波を照射した。この際に、隙間距離、PBS 浸漬時間、照射出力、照射回数および照射位置を調節して、照射後に形成される除去領域と周囲の細胞の評価を下記のように評価した。また、高周波帯の振動を用いるため、周囲の細胞に対する熱の影響も懸念された。このため、照射時の培養ディッシュの温度を放射温度計により測定するとともに照射後の細胞を再播種し、細胞増殖性を以下の手順を用いて評価した。

ø35 培養ディッシュ上に C2C12 を播種し、90% コンフルエントになるまで培養した。超音波をディッシュ底面から照射してターゲットの細胞を除去した。除去後に残存した細胞をトリプシン EDTA で回収し、細胞数を測定して再播種した。再播種 72 時間後の細胞数を測定し、通常の培養方法での細胞増殖性と比較した。

4. 研究成果

【平成 29 年度】

細胞の局所的な剥離手法について超音波ホーンまたは SAW デバイスのどちらを使用するかを検討した。超音波ホーンを用いて細胞剥離を行った場合には、200 μm を下回る大きさの除去範囲での細胞除去を行うことは困難であった。これは先が細い場合にも斜め方向の音響放射圧が生じるため、結果としてホーン先端径よりも大きい剥離領域ができてしまう。また、照射した際に全く剥離しないことがある。これらのことから結果として、超音波ホーンでは任意の位置を局所的に剥離することが困難であることが明らかとなった。このため、SAW デバイスを用いて細胞の局所的な剥離手法について着手した。極小領域での細胞剥離を達成するために一点に超音波振動を集中することができるくし歯電極が収束するようにリチウムナイオベート基盤に蒸着された Focus SAW デバイスを設計した。

【平成 30 年度】

2 年目には、一点に超音波振動を集中することができる Focus SAW デバイスを製作して、使用することで、任意の位置で直径 100 μm 程度の大きさまで剥離領域を限定できることを確か

めた。一方で、一度の剥離操作では、細胞が剥離しないこともあることが確かめられた。また、細胞が剥離しない問題を解決するために培地中ではなく、生理食塩水（PBS）に浸漬して細胞剥離を行った。その結果、任意の位置で直径 100 μm 程度の大きさまで剥離領域を限定できることを確かめた。さらに、超音波の照射距離と出力は剥離の成功率に大きく依存しているが、一方で照射回数は剥離の成功率には大きな差はないことが明らかとなった。また、超音波ホーンでは中心からの距離が離れると細胞剥離の成功率が大きく低下したが、一方で Focus SAW を用いた場合には、距離が離れた場合にも細胞が剥離することを確認した。また、剥離後の細胞除去領域の周囲の細胞の生死判定を行ったが、死細胞はほとんど見られず、残存する細胞を損傷せずに剥離できることが確かめられた。

本システムは、試薬を投与する必要なく、多様な細胞種に対応できることから、再生医療の臨床化のための iPS 細胞の大量培養システムの発展・普及に寄与することが期待できる。今後は、Focus SAW デバイスと培養ディッシュとの距離の取り方の精度を向上させていくことで、より微小な範囲の細胞を剥離する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- [1] Takumi Inui, Yuta Kurashina, Chikahiro Imashiro, Kenjiro Takemura, “Method of localized removal of cells using a bolt-clamped Langevin transducer with an ultrasonic horn,” *Engineering in Life Sciences*, 2019. [in press] 査読あり
- [2] Hanako Tauchi, Chikahiro Imashiro, Taiki Kuribara, Genichiro Fujii, Yuta Kurashina, Kiichiro Totani, Kenjiro Takemura, “Effective and intact cell detachment from a clinically ubiquitous culture flask by combining ultrasonic wave exposure and diluted trypsin,” *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2019. [in press] 査読あり
- [3] Yuta Kurashina, Makoto Hirano, Chikahiro Imashiro, Kiichiro Totani, Jun Komotori, Kenjiro Takemura, “Enzyme-free cell detachment mediated by resonance vibration with temperature modulation,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 114, no. 10, pp. 2279-2288, 2017. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

- [1] Takumi Inui, Yuta Kurashina, Chikahiro Imashiro, Kenjiro Takemura, “Selective cell elimination mediated by ultrasonic irradiation,” 2018 IEEE International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, Hawaii, US, 2018/7/18–20.
- [2] 乾拓未, 今城哉裕, 中尾美紗, 倉科佑太, 竹村研治郎, “ホーン付きランジュバン型振動子を用いた接着性細胞の選択的除去,” 第 16 回日本再生医療学会総会, 宮城, 2017/3/7.

〔図書〕(計 1 件)

- [1] 倉科佑太, 竹村研治郎, “動物細胞培養・自動化におけるトラブル発生原因と対策 5 章 6 節 細胞培養基材の共振を用いた効率的細胞培養方法,” 技術情報協会, pp. 190-196, 2017.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：竹村 研治郎 , James Friend
ローマ字氏名：Takemura Kenjiro , James Friend

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