

機関番号：16101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21760081

研究課題名（和文） ストレッチを受ける細胞のリアルタイムその場観察による刺激受容部の力学場評価

研究課題名（英文） Evaluation of mechanical field of cellular structure in stretched cell using real time in situ observation method

研究代表者

佐藤 克也(SATO KATSUYA)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・講師

研究者番号：10403651

研究成果の概要（和文）：

本研究では、ストレッチ（伸展）刺激を受ける細胞の刺激を受容する細胞部位を特定し、さらにその部位におけるひずみや応力などの力学場を評価することを目的とした。そのために、MEMS 技術を応用したマイクロデバイスを開発した。デバイスの構造設計ならびに製作プロセス設計によって提案したデバイスが製作可能であることを実証した。さらに細胞培養適合性上の問題を解決し、実際にストレッチを受ける細胞のその場観察が可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, the aim is to evaluate mechanical field of cellular structure in stretched cell. We have developed novel cell stretching microdevice using MEMS technology. We proved the validity of our proposed structure design and fabrication process of the microdevice. We modified the washing process to improve bio-compatibility of the device. Finally, we demonstrated that our device enables to conduct in situ real time observation of stretched cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：バイオメカニクス

科研費の分科・細目：機械工学・機械材料，材料力学

キーワード：生体力学，細胞力覚，MEMS

1. 研究開始当初の背景

力学的刺激に対する細胞応答特性および感知機構の解明は、細胞活動を制御する外部刺激因子としての応用の可能性を秘めており、バイオメカニクスにおける重要な課題の一つである。

これまで、細胞群レベルでの実験的検討によって、細胞周囲の力学環境と平均的な細胞の応答特性については様々な報告がなされている。ただし、これらの報告の多くは、周囲の流体流速から換算したせん断応力や静

水圧、細胞接着基質のひずみ量など、細胞周囲の力学環境をマクロ的に評価するにとどまっている。

また一方では、力学的刺激を細胞内の生化学シグナルへと変換する機構要素として細胞膜上のチャンネルなど、タンパク質分子レベルでの微細な研究もなされている。例えば、伸展活性(Stretch Activate:SA)チャンネルに対しては、パッチクランプ技術によって細胞膜に作用する張力と SA チャンネル活性との関係が既に定量的に評価されている。また、

我々も単一の細胞に対して先端直径 10 ミクロン程度のマイクロニードルを押し込むことで局所変形を与え、その際の細胞応答発生部位におけるひずみ場を定量的に評価し、細胞構造レベルでのひずみ量と刺激応答発生との関係について報告している。

しかしながら、これら細胞群レベルでの検討と膜タンパクなどの微細なレベルでの検討の間には大きなスケールギャップがあり、それらを結びつけるメソスケールでの検討は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに報告された例のない、ストレッチ刺激を受ける細胞をリアルタイムでその場観察することによって、単一細胞およびさらに微細な細胞内微細構造レベルでの変形挙動と細胞応答との関連を明らかにし、これまでなされていなかった、細胞群レベルとタンパク質分子レベルとの間をつなぐメソスケールでの力学刺激応答機構解明を目指す。そのために、広く一般的に用いられており、かつ生理学的解釈も容易なストレッチ刺激を細胞に与え、その際の細胞応答を詳細に観察可能な実験系構築を目指す。既存のストレッチ負荷デバイスでは、ストレッチ時に細胞に生じる剛体変位が制御されておらず、ストレッチ中のその場観察が困難であった。そこで、MEMS 技術を応用してストレッチ負荷デバイスを顕微鏡視野内に収まる程度までマイクロ化しこれらの問題を解決する。開発するマイクロデバイスを用いて実際に細胞応答をリアルタイムでその場観察し、細胞構造に生じるひずみなどの力学場と細胞応答発生箇所との詳細な関連について評価する。具体的には、

- (1) ストレッチを受ける細胞を単一細胞レベルでリアルタイムその場観察するための、細胞伸展マイクロデバイスを開発する。
- (2) 開発したデバイスを用いて、ストレッチを受ける細胞におけるカルシウム応答発生部位を特定する。
- (3) 細胞内微細構造の変形挙動を明らかにすることで、カルシウム応答発生部位とその場における力学状態との関連を明らかにする。

以上、3 点を目的とした。

3. 研究の方法

まず、ストレッチを受ける細胞のリアルタイムその場観察をするための細胞伸展マイクロデバイスの開発を行う。これまでの研究により、デバイスの基本的な製作プロセスは確立済みであった。そこで、デバイスを駆動するための外部駆動装置として圧電素子を用いたマイクロマニピュレーター装置を製作した。市販の水圧式三次元マイクロマニピュレーターに、一軸スライダおよび圧電素

子から構成される駆動部を組み合わせて製作する。これにより電圧制御を用いて精度の高いデバイス駆動を可能にする。

続いて、製作したデバイスの細胞培養適合性について検討する。デバイス製作プロセスでは、細胞毒性を有する薬品も使用する。そのため、細胞実験に供するためには、適切な洗浄プロセスを確立する必要がある。薬品を確実に除去しつつ、デバイス構造体に損傷を与えない洗浄条件を検討する。洗浄パラメータを変化させたデバイスを用意し、実際に観察対象となる骨芽細胞をデバイスに設けた伸展マイクロチャンバー上で培養することで、正常に培養できることを確認する。

デバイスの動作および細胞培養適合性が確認できた後に、細胞をカルシウムイオン蛍光指示薬で染色した状態で、実際に細胞伸展マイクロデバイスを作動させ、ストレッチを受ける細胞のリアルタイムその場観察が可能であることを実証する。

4. 研究成果

本研究の推進によって、以下の成果が得られた。また当初の想定にはなかった新たな課題も生じた。それらについて以下にまとめて示す。

- (1) 圧電素子を外部駆動源とする細胞伸展マイクロデバイスの開発が完了した。デバイスの動作試験の結果、単一の細胞に対して、最大で 50% の短軸引張りひずみを付与可能であることが分かった。
- (2) 提案した製作プロセスによって、設計通りの細胞伸展マイクロデバイスが製作可能であることを確認した。しかしながらデバイス製作の歩留まりが想定よりも低く、不良率が 80% 程度にまで達することが分かった。これに対して、歩留まりを向上させるためのプロセス改良を行った。歩留まりを低下させていた原因の一つが、別プロセスで製作されている伸展マイクロチャンバーとリンク駆動機構との位置合わせ（アライメント）プロセスであることを解明し、顕微鏡観察下においてアライメントを行うためのプロセス改良を行った。これまでは一度アライメントを行うと修正が非常に困難であったが、エタノール湿潤状態でアライメントを行うことで修正作業が可能となり、結果としてデバイス製作の歩留まりを改善し、不良率を 40% 程度まで低下させることに成功した。
- (3) 開発したデバイスの細胞培養適合性の試験を行い、適合性を持たせるためのプロセス開発も完了した。当初の適合性試験を行った結果、細胞活

性が低下する問題が生じた。製作プロセス全体を再点検した結果、その原因が、伸展マイクロチャンバーの材料であるシリコンエラストマーに残留した酸素分子であることを解明した。また、その対策として90℃熱水による浸漬処理によって残留酸素を取り除くことが有効であることを示した。これによって、デバイス上で問題なく細胞培養が行えることを確認した。

- (4) 低倍率であるドライ対物レンズを用いて、ストレッチを受ける細胞のリアルタイムその場観察が可能であることを確認した。またポリスチレンマイクロビーズをトラッキングマーカーとして、伸展マイクロチャンバーに生じるひずみ計測を行い、細胞に付与されるひずみ場の見積りを行った。
- (5) 最終的な目標である、細胞内微細構造レベルでの変形挙動を観察するために高倍率・高開口数である油浸対物レンズを用いた観察を試みた際に、当初の想定以上に焦点軸方向への剛体変位が発生することが分かった。この剛体変位により油浸対物レンズにおいてはピントずれが生じ、詳細なその場観察は困難なことが分かった。しかしながら、観察平面方向への剛体変位については、当初の想定通り良好に抑制されており、ストレッチを付与している間においても観察視野から外れることはなく、その場観察が可能であることを実証した。
- (6) 油浸対物レンズを用いた場合のリアルタイムその場観察において問題となった、焦点軸方向への剛体変位について、その抑制策の検討を行った。その結果、リンク機構において駆動アームを保持している軸受け部とアームとのクリアランスがガタとなり、想定よりも大きな剛体変位を生じさせていることを明らかにした。その対策として、構造設計を大幅に変更した改良型デバイスの設計を開始した。研究計画年度終了時点においては、まだ完成していないが、初期検討において、再設計したデバイスでは、可動部分におけるクリアランスを無くした状態でも、正常に動作可能であることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- (1) Katsuya SATO, Satoshi KAMADA and Kazuyuki MINAMI : “Development of microstretching device to evaluate cell membrane strain field around sensing point of mechanical stimuli”, International Journal of Mechanical Sciences, Vol. 52, No. 2, pp. 251-256, 2010. 査読有

[学会発表] (計6件)

- (1) 門司 亮, 南 和幸, 中島 雄太, 佐藤 克也, 中野 圭悟 : “高精度化細胞伸展マイクロデバイスの設計と試作”, 日本機械学会中国四国支部第49期総会, 2011年3月5日, 岡山理科大学.
- (2) 中野 圭悟, 佐藤 克也, 中島 雄太, 南 和幸 : “ひずみ勾配場における細胞応答を観察するための細胞伸展デバイスの開発”, 日本機械学会第23回バイオエンジニアリング講演会, 2011年1月8日, 熊本大学.
- (3) Katsuya SATO and Kazuyuki MINAMI : “Observation of initial calcium signal response to uniaxial stretching in a single osteoblastic cell using novel cell stretching microdevice”, 6th World Congress of Biomechanics, 2010年8月4日, Singapore.
- (4) 鎌田 慧, 佐藤 克也, 南 和幸 : “伸展刺激を受ける骨芽細胞応答のリアルタイムその場観察の試み”, 日本機械学会第22回バイオエンジニアリング講演会, 2010年1月9日, 岡山理科大学.
- (5) 佐藤 克也, 鎌田 慧, 南 和幸 : “伸展刺激を受ける細胞のリアルタイム観察を可能にする細胞伸展MEMSデバイスの開発”, 日本機械学会 福祉工学シンポジウム2009, 2009年9月24日, 高知工科大学.
- (6) 佐藤 克也, 鎌田 慧, 南 和幸 : “伸展細胞のin situ観察を可能にする細胞伸展マイクロデバイスの開発”, 平成21年電気学会電子・情報・システム部門大会, 2009年9月3日, 徳島大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 克也 (SATO KATSUYA)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス
研究部・講師

研究者番号 : 10403651

(2) 研究分担者 なし
()

研究者番号：

(3) 連携研究者

南 和幸 (MINAMI KAZUYUKI)
山口大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：00229759

中島 雄太 (NAKASHIMA YUTA)
山口大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：70574341