

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 7 日現在

| |
|---|
| 機関番号：14401 |
| 研究種目：若手研究（B） |
| 研究期間：2011～2012 |
| 課題番号：23700557 |
| 研究課題名（和文） 磁気アルキメデス効果を利用した非標識細胞アセンブリによる筋組織構築 |
| 研究課題名（英文） Muscle tissue construction by label-free cell assembly based on the magneto-Archimedes effect |
| 研究代表者 秋山 佳文（AKIYAMA YOSHITAKE） 大阪大学・大学院工学研究科・講師 研究者番号：80585878 |

研究成果の概要（和文）：本研究では，細胞のみからなる 3 次元組織の生体外構築に向けて，磁気アルキメデス効果を利用した 3 次元細胞アセンブリデバイスの設計，作製を行った。まず，磁気アルキメデス効果を利用するためには，MRI 造影剤等の常磁性化合物を培養液に添加する必要があるため，まずその細胞毒性が十分に低いことを確認した。次に，作製したデバイスを用いて，筋芽細胞を凝集させ，筋組織構築を試みた。

研究成果の概要（英文）：In the present study, a cell assembly device for in-vitro three-dimensional (3D) tissue construction based on the magneto-Archimedes effect was designed and fabricated. So as to utilize the magneto-Archimedes effect, it is necessary to add paramagnetic compound like an MRI contrast agent to the culture medium. We confirmed that its cytotoxicity was low enough. We also aggregated myoblast cells with the developed device and tried construct a 3D muscle tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|-----------|-----------|-----------|
| 交付決定額 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：組織工学，磁気アルキメデス効果，細胞アセンブリ

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて ES 細胞だけでなく iPS 細胞が樹立され，各細胞への分化技術が確立されつつあるのに伴い，ティッシュエンジニアリングの可能性が大きく広がっている。これまでに，ポリ乳酸等の生分解性ポリマーの足場に細胞を播種することで組織の再構築が行われてきているが，臨床応用が行われているのは，皮膚，骨，軟骨，膀胱などで，比較的単純な組織構造と生理機能を有しているもののみであり，また問題点として，足場内で代謝不良による細胞の壊死や分解物による炎症などが問題となっている。足場を用いない手法としては，東京女子医大の岡野らのグル

ープによる細胞シート工学が挙げられる。細胞シート工学では，温度応答性ポリマーを用いることで細胞をシート状で回収するもので，角膜や心筋シートなどが開発され，臨床応用が進められている。一方，生体外で 3 次元組織を構築するために，九州大の井藤らや Texas 大の Pasqualini らのグループは，それぞれ独自に細胞を磁性微粒子で標識する方法を開発し，生体外での磁場による 3 次元組織構築を行っており，各種形状の組織を報告しているが，最終的に磁性微粒子を細胞から取り除く方法が問題となる。

2. 研究の目的

本研究では、磁気アルキメデス効果による反磁性細胞マニピュレーション用いた3次元組織構築法の有用性を検証する。最終的には、図1に示すような生体の3次元データを基に、細胞を3次元形状に凝集させて生体外で組織を構築するようなデバイスの開発を目指しており、本研究では、筋芽細胞を3次元形状に凝集させることで、筋組織を目指す。

3. 研究の方法

(1) 磁気アルキメデス効果

溶液中の細胞に作用する磁力 F_m は以下の式(1)で表される。

$$F_m = \frac{(\chi_p - \chi_m)V}{\mu_0} (\mathbf{B} \cdot \nabla) \mathbf{B} \quad (1)$$

ここで、 χ_p, χ_m : 細胞および培養液の磁化率、 V : 細胞の体積、 μ_0 : 真空の透磁率、 \mathbf{B} : 磁束密度である。細胞にかかる力と磁化率の差の関係を図2に示す。通常の培地と細胞では磁化率の差が無視できるほど小さいため、細胞にはほとんど力は働かない(図2(a))。また、通常の培養液中において磁性粒子で標識した細胞は磁化率の差が正になるため、引力が働く(図2(b))。一方、強磁化合物を加えた常磁性培養液中の細胞は磁化率の差が負になり、細胞が受ける力は磁性粒子と比べて反転するため、磁場によって反発する(図2(c))。以上より、常磁性体を含む溶液中の細胞は反磁性体として働くことがわかる。

式(1)より、高磁化率を持つ培養液中の細胞に働く力は、磁束密度の大きさと勾配の積に比例するので、その積が大きい領域では細胞は反発する力を受ける。一方、磁束密度が小さい領域では細胞は力をほとんど受けないの

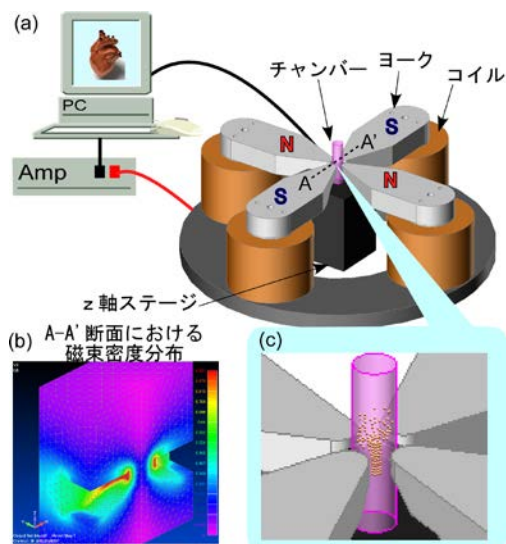


図1 (a)3次元細胞アセンブリデバイス概要、(b)磁束密度分布、(c)チャンパー拡大図

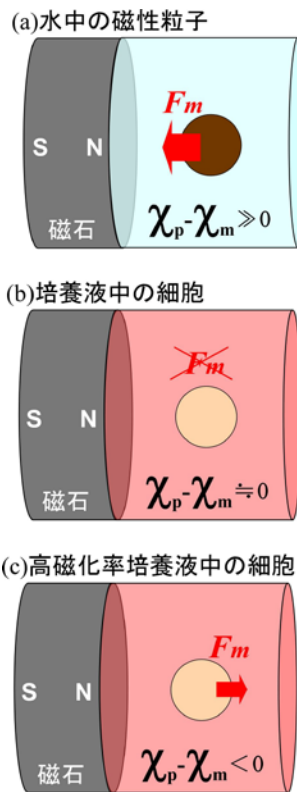


図2 磁性粒子および細胞にかかる磁力

で、細胞は磁束密度が最も小さいところに凝集すると言える。

(2) 3次元細胞アセンブリデバイス

アセンブリデバイス(図1)に示すような構成となっている。鉄芯のまわりにコイルを巻き、電流を流すことによって一時的に磁力を発生させる。本装置では向かい合うヨークが同じ磁極となるように設定した。例えば、全てのコイルに均一の電流を流すと、2つのN極から出た磁束は、2つのS極に吸い込まれるため、結果的に中心部に最も磁束密度が低い領域(ゼロ磁場領域が形成される(図1(b))。これまでの研究で用いていたネオジウム磁石では、磁束密度分布を変化させることが出来なかったが、本装置はコイルに流す電流を変化させることで、磁束密度分布を変化させることができる。つまり本装置では粒子の集まる位置を変化させることができる。また、ヨークの先端がそれぞれ向かい合う領域(直径10mm程度)にて、細胞をハンドリングする(図2(c))。

実際の装置の写真を図3に示す。4つのヨークの中心部に直径10mmのチャンパーを設置し、その様子を真横からCCDカメラにて観察した。

(3) 常磁性化合物の毒性評価

Premix WST-1 キット(タカラバイオ)を用い

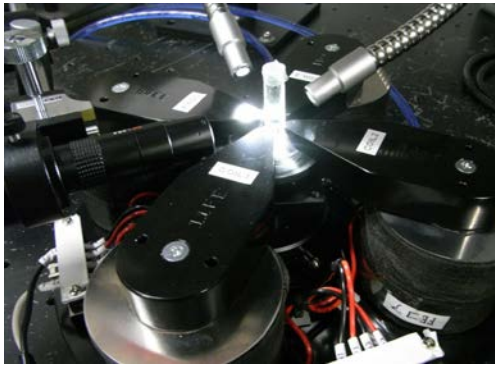


図3 3次元細胞アセンブリデバイスの写真

て96ウェルプレートにて、常磁性化合物の細胞毒性の評価を行った。細胞には、ヒト肝ガン細胞株 HepG2 を用いた。本研究では、常磁性化合物として、MRI 造影剤として人体への投与が認められているガドリニウム化合物 (Gd-DOTA) を用いた。

(4) 蛍光ポリスチレンビーズによるアセンブリデバイスの評価

細胞を用いた実験に先立ち、アセンブリデバイスの性能を評価するため、サイズおよび磁化率が細胞とほぼ等しい蛍光ポリスチレンビーズを Gd-DOTA を含む培養液に分散し、その挙動を観察した。

4. 研究成果

(1) Gd-DOTA の毒性

コントロールを 100% として場合の書く条件における細胞活性を図 4 に示す。80 mM にて

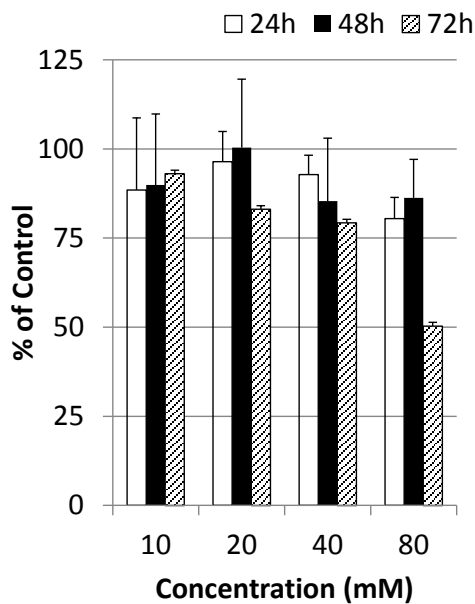


図4 Gd-DOTA の細胞毒性

72 時間培養した後は、活性がコントロールの半分となり明らかな毒性が見られたが、それ以外の条件における活性の低下は小さかった。また、40 mM においては 24 時間後もコントロールと比べて有意差が見られなかったため、今後アルブミン産出など詳細な評価を行う必要はあるが、Gd-DOTA 40 mM への 24 hours の暴露による増殖への影響はほとんど無いと言える。これ以降の実験では、Gd-DOTA を終濃度 40 mM となるように添加した培養液を用いることとした。

(2) 磁場解析による凝集位置の検討

まず、シミュレーションを用いて、どのような電流を流せばゼロ磁場領域が移動するか検討した結果、それぞれのコイルに流す電流を正弦波として、その位相を各コイルでずらすことで凝集位置を制御することが出来るということを見出した。そこで、シミュレーションにより、どの程度移動するかを算出した。

例えば、電流の振幅 2 A, オフセット 2 A の場合を図 5 に示す。また、各位相における磁束密度分布の解析結果を図 6 に示す。例えば、位相 0° の場合、各コイルに流す電流は、2-4-2-0 [A] となり、ゼロ磁場領域は中心からコイル 4 にずれる (図 6(a))。位相 45° の場合、3.41-3.41-0.59-0.59 [A] となり、ゼロ磁場領域はコイル 3, 4 の中間方向にずれる (図 6(b))。同様に、 90° および 135° に

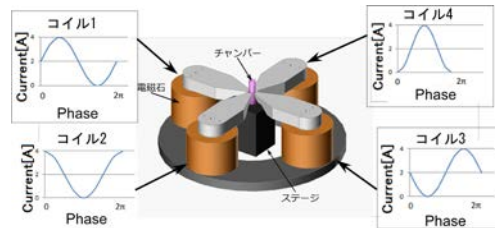


図5 コイルに流す電流

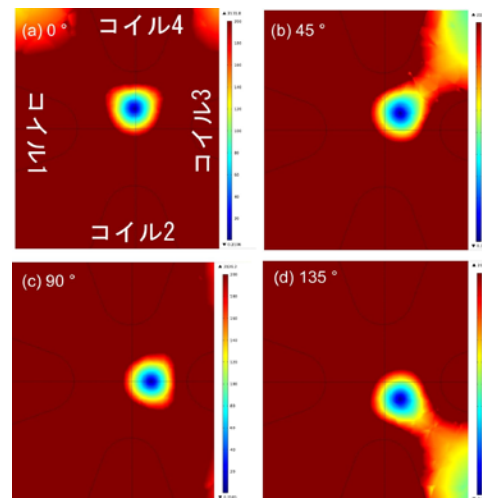


図6 各位相における解析結果

ける結果を、図 6(b)および(c)に示す。明らかに、それぞれ狙った角度にゼロ磁場領域が移動していることが確認できた。従って、位相をずらすことで、細胞を円周上の任意の位置に凝集させることができると予想される。また、凝集する円の半径については、電流の振幅を大きくすることで小さく、また、小さくすることで大きくなることは実験により確認できたが、詳細については現在検討中である。

(3) 蛍光ビーズによる凝集実験

電流の振幅 2 A, オフセット 2 A において、蛍光ビーズの凝集実験を行った。各角度において各コイルに流した電流を、コイル 1 から 4 の順で以下に示す。

| | |
|------|--------------------------|
| 10° | :3.97-1.65-0.03-2.35 [A] |
| 20° | :3.88-1.32-0.12-2.68 [A] |
| 30° | :3.73-1.00-0.27-3.00 [A] |
| 40° | :3.53-0.71-0.47-3.29 [A] |
| 45° | :3.41-0.59-0.59-3.41 [A] |
| 90° | :2.00-4.00-2.00-0.00 [A] |
| 180° | :4.00-2.00-0.00-2.00 [A] |
| 270° | :2.00-0.00-2.00-4.00 [A] |

各角度における蛍光ビーズ凝集位置を計測し、それらを通る近似円を最小二乗法により描くと、中心が(0, 0)で、半径が 2.18 [mm]の円となった(図 7)。このように、電流を正弦波とし、各コイルの位相をずらすことで、円周上の任意の位置に粒子を凝集させることができることを確認した。

(4) 細胞凝集体の形成

ラット筋芽細胞株である C2C12 細胞を用いて、細胞凝集実験を行った。添加する強磁性化合物は、ビーズの場合と同様に Gd-DOTA を使用し、終濃度 80 mM になるように添加した。ま

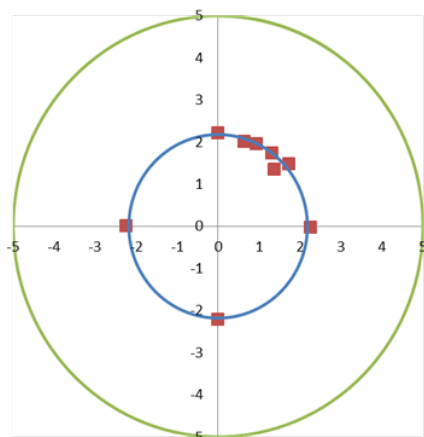


図 7 各角度における蛍光ビーズ凝集位置(赤四角)とそれらを通る近似円(青)

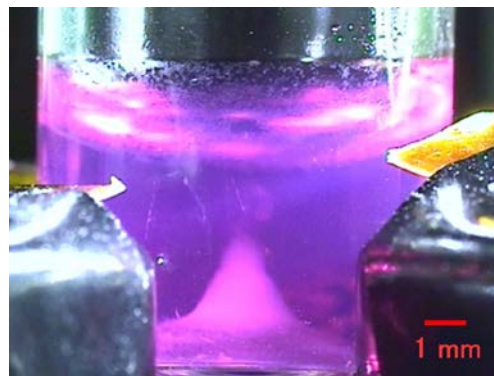


図 8 細胞凝集体

た、培地の浸透圧は NaCl を減らすことで調整し、Percoll を用いて比重は 1.045 に調整した。また、全てのコイルに 4 A の定電流を流し、チャンバーの中心に細胞が凝集する条件とした。2.0×10⁵ cells/ml の細胞の懸濁液 300 μl をチャンバに入れ、コイルに 4 A の電流を流し、その様子を観察した。

最初は全体に均一に漂っていた細胞が、蛍光ビーズの場合と同様に、開始 20 分程度でほとんどの細胞は中心に集まり凝集体を形成した(図 8)。また、細胞凝集体の形状は容器底面から離れるほど幅が狭くなる三角錐状になった。以上のように、3 次元細胞アセンブリデバイスを作製し、筋芽細胞のみから成る 3 次元組織を構築することに成功した。

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 2 件)

- ① Y. Akiyama, T. Hoshino, M. Hashimoto, K. Morishima: “Evaluation of mechanical stimulation effect on cellular orientation under confluence based on 2D-FFT and principal component analysis,” *Journal of Micro-Nano Mechatronics*, **7**(1-3), pp 69-77 (2012).
- ② Y. Akiyama, T. Hoshino, K. Iwabuchi, K. Morishima: “Room temperature operable autonomously moving bio-microrobot powered by insect dorsal vessel tissue.” *PLoS ONE*, **7**(7), e38274 (2012).

[学会発表] (計 10 件)

- ① 正典子, 森島圭祐, 秋山佳文, “磁気アルキメデス効果を用いた電磁石による細胞凝集法の検討” 日本バイオマテリアル学会大会シンポジウム 2012, 仙台国際センター(宮城), p. 343 (2012. 11. 27).

- ② Y. Akiyama, K. Morishima, "Development of 3D cell aggregation system using magneto-Archimedes effect," International Conference on Biofabrication 2012 (Biofabrication 2012), Manchester (UK), (2012. 10. 31).
- ③ 秋山佳丈, 森島圭祐, "磁気アルキメデス効果によるマイクロ流体チップ内での超高速スフェロイドアレイ形成と回収" 第 64 回日本生物工学会大会, 神戸国際会議場 (兵庫), 3Bp17 (2012. 10. 25).
- ④ Y. Akiyama, K. Morishima, "Label-free ultrarapid spheroid formation in microfluidic chip using magneto-Archimedes effect," The 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS), Paris (France), pp. 116-119 (2012. 2. 1).
- ⑤ 秋山佳丈, 森島圭祐, "マイクロ流体チップ内でのノンラベル高速スフェロイドアレイ形成" 第 21 回インテリジェント材料/システムシンポジウム, 東京女子医科大学(東京), p. 25 (2012. 1. 10).
- ⑥ Y. Akiyama, K. Morishima, "Spheroid array formation by non-label cell manipulation using magneto-Archimedes effect," The 23th International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS 2011), Nagoya (Japan), pp. 45-50 (2011. 11. 7).
- ⑦ 秋山佳丈, 森島圭祐, "磁気アルキメデス効果を用いた超高速ラベルフリー細胞アセンブリ法の有用性の検証" 第 33 回日本バイオマテリアル学会大会, 京都テレサ (京都), 05-4 (2011. 11. 21).
- ⑧ Y. Akiyama, K. Morishima, "Hollow cylinder-shaped tissue formed by magneto-Archimedes cellular assembly," International Conference on Biofabrication 2011 (Biofabrication 2011), Toyama (Japan), p. 43 (2011. 10. 6).
- ⑨ 秋山佳丈, 森島圭祐, "磁気アルキメデス効果を用いた非標識超高速細胞アセンブリ法による生体外 3 次元組織構築" 第 63 回日本生物工学会大会, 東京農工大学 (東京), 2Gp05 (2011. 9. 27).
- ⑩ 秋山佳丈, 森島圭祐, "磁気アルキメデス細胞アセンブリ法による多層スフェロイドの形成" 第 29 回日本ロボット学会学術講演会, 芝浦工業大学 (東京), 1D2-5 (2011. 9. 7).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 佳丈 (AKIYAMA YOSHITAKE)
 大阪大学・大学院工学研究科・講師
 研究者番号：80585878