

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：34310

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26289010

研究課題名(和文) 生体適合圧電材料MgSiO<sub>3</sub>を用いた神経再生用力学・電磁場創生デバイスの開発研究課題名(英文) Development of Mechanical Electro-Magneto Nerve Regeneration Device with Biocompatible Piezoelectric Material MgSiO<sub>3</sub>

研究代表者

仲町 英治 (NAKAMACHI, EIJI)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：60099893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：以下の成果を得た。(1)3次元軸索伸展予測用セルラーオートマトン解析法を確立した。(2)疑似神経細胞PC12の軸索伸展促進用Bio-MEMSデバイスを開発し、細胞間距離および相対角度が軸索伸展に及ぼす影響の評価を行った。(3)生体適合圧電材料MgSiO<sub>3</sub>を用いた多層膜ダイヤフラムによる応力・静電磁場負荷装置を製作した。(4)交流電磁場創生デバイス開発と細胞活性の評価実験を行った。(5)力学・電磁場細胞周辺環境創生デバイスにより、PC12軸索伸展促進効果を検証した。引張刺激下では25.2%；一様磁場刺激下では37.4%；力学・電磁場ハイブリッド刺激下では70.0%の軸索伸展促進が確認された。

研究成果の概要(英文)：We developed a Mechanical Electro-Magneto Nerve Regeneration Device with Biocompatible Piezoelectric Material MgSiO<sub>3</sub>, as demonstrated below: (1) Cellular Automaton Simulation code. (2) Bio-MEMS device for activate the axonal extension of nerve cell PC12 to study the influence of cell interval and zenith corner angle. (3) Multi-layer diaphragm using the biocompatible piezoelectric material MgSiO<sub>3</sub> to generate mechanical static electro magneto field. (4) AC magneto field stimulation device for PC12 axonal extension acceleration. (5) Electro magneto mechanical stimulation device in the extra-cellular environment to activate PC12 cell and axonal extension. We confirmed that increases of 25.2% in case of mechanical stimulation, 37.4% in the uniform magneto field stimulation and 70.0% in the mechanical electro magneto hybrid stimulation.

研究分野：機械材料・材料力学

キーワード：生体適合材料 再生用デバイス 電磁場刺激 力学刺激 神経細胞PC12 神経軸索伸展 コンピュータシミュレーション

## 1. 研究開始当初の背景

2004年に京都大学清水博士らによるポリ乳酸を用いた編物繊維構造にコラーゲン塗布を行った複合神経再生用チューブを用いた神経再生実験により、1日2mmの進展速度を実現した先駆的な研究に触発され、神経再生用足場の開発研究が進んでいる。しかし、抹消および中枢神経の再生のためには、**細胞の活性と組織再建プロセスの解明を目的とした、足場用材料およびその構造、さらに細胞周辺環境**に関する系統的な研究が必要と考える。

労務災害、交通事故および悪性主要切除などにより神経組織が損傷した場合、欠損部位が長い場合は直接縫合を採用することができず、自家神経移植が行われている。しかし、自家神経移植には健常神経採取に伴う知覚の欠如、採取量の限界、合併症の発症など多くの課題を抱えている。そこで、人工のガイドチューブ、つまり神経チューブで欠損部を繋ぎ再生を促進する神経再生医療の研究が進んでいる。ただし、臨床応用実験において、抹消神経については成果を上げているものの直径の大きな中枢神経に関してはほとんど成果を上げていないことから、系統だった神経チューブの開発が必要と考える。神経チューブの開発においては、**1) 材料、2) 構造、3) 細胞周辺環境**が課題となる。1) 神経チューブの材料についてはPLAはじめPGA(ポリグリコール酸)、PCL(ポリε-カプロラクトン)、さらにキトサンを用いた新規材料の開発が進んでいるが、PLAに対して絶対的な優位性を持つ材料は発見されていないと考える。2) 構造については、神経の外層と内層に構造の相違があることから、PLA ナノファイバーを用いたエレクトリックスピニング(ES)チューブ創製一般に神経には血管のような力学刺激は少ないとされているが、その細胞周辺環境については、Blackmanらによる一様磁場刺激による神経軸索伸展促進の研究報告に見られるように電磁場刺激の有効性が指摘されている。現在、膜厚3μmの4層膜MSOが正方晶(101)方位を持ち、図4に示すように電界一ひずみバタフライ曲線を示し、圧電特性 $d_{33}=179\text{pm/V}$ を有するという成果を得た。しかし、4層3μmでは、MEMS マイクロ流路の駆動用ポンプとしては出力が不足しており、数十μmの膜厚を得るための創製手法の開発が必要である。発電では、生体内で荷重支持骨格部位に設置する物理力を電気力に変換する多層膜発電デバイスの開発を目指す。現在、PZTを用いた発電デバイスの開発は進んでいるが、生体内埋め込みを目指す研究は皆無の状態であり、本研究には新規性があると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者らが開発した**生体適合圧電材料 MgSiO<sub>3</sub>(MSO と略記)を用いた神経再生のための力学・電磁場創生デバイス**

**の開発**を目指す。申請者らは過去の科研費補助により生体適合圧電材料としてペロブスカイト型正方晶構造を持つ**MSO**を発見し、スパッタ装置により多層薄膜の創製に成功した。**MSO**の元素は地球に無尽蔵であるマグネシウム、シリコンと酸素であり、レアアースを使用する他の無鉛圧電材料に対して優位と考える。本研究では、高出力を可能にする**MSO**多層膜による力学・静電磁場負荷に加え、ポールピース構造を持つ導電磁場負荷を重合することで、疑似神経細胞PC12の軸索伸展の加速を可能にする**Bio-MEMS**デバイスの創製を目指す。本デバイスを用いたin-vitro実験により得られた知見は、抹消・中枢神経組織の再生速度の向上を目指す新たな神経再生用足場の開発および細胞周辺環境の構築に活かされると考える。

## 3. 研究の方法

本申請研究は、**(1)コンピュータシミュレーションによる軸索伸展に対する細胞周辺環境の影響の検討、(2)疑似神経細胞PC12による単細胞、2細胞、多細胞の軸索伸展メカニズム解明のためのMEMSデバイスの開発、(3)圧電材料MSOを用いた力学負荷デバイスを作製し、2次元応力・電磁場負荷の神経軸索伸展への影響解明実験、(4)ポールピースを用いた電磁場負荷任意磁場勾配を持つ細胞周辺環境の創生とその細胞活性との関係解明、最後に(5)MSO薄膜・ポールピース電磁場の重合による力学・電磁場細胞周辺環境デバイスの創製とナノファイバー神経チューブを用いた軸索伸展観察により、神経軸索伸展、つまり神経再生のために最適な細胞周辺環境の創生を目指す。**

以下に詳細を示す。(1)仲町らが開発したトリプルスケール解析手法により、多結晶多層膜の誘電率および圧電特性の高精度予測を行う。トリプルスケール解析は、nmスケールの第一原理計算およびμm・mmスケールの結晶均質化有限要素解析により構成されている。(2)MSO多層膜創製では、既設のRFマグネトロンスパッタ装置により、**MSO**の高速成膜を実現する。高配向正方晶多層膜構造体を創製するために、基板材料、温度制御、酸素・アルゴン流量制御、厚膜化に関する最適条件探索を行う。半導体製造技術を採用することから基板材料としては図3に示すようにシリコンを用いるが、中間層にCuを、電極としてPtおよびTiを用いる。(3)流量μl/秒の血液およびナノメディシンの輸送を目指し、**MSO**多層膜モノモルフ型アクチュエータを駆動デバイスとするマイクロポンプシステムを設計・製作する。(4)骨格力学支持部位に設置する**MSO**多層膜モノモルフ型発電システムを設計製作する。本申請研究期間において、駆動・発電デバイスの機能評価を個別に行

った後、Bio-MEMS システムを組み立てることにする。

#### 4. 研究成果

本研究では、生体適合圧電材料  $\text{MgSiO}_3$  (MSO と略記) を用いた神経再生のための力学・電磁場創生デバイスの開発を目指しており、以下に主要 5 課題に関する研究成果を示す。

(1) 解析プログラムの開発では、3次元軸索伸展シミュレーションへの展開可能な新手法としてセルラーオートマトンを採用し、プログラムの作成と実験との比較を行い、本プログラムの有効性を確認した。(担当：仲町・森田・博士前期課程学生 1 名)：本年度はフェーズフィールド法に加え、新たに、セルラーオートマトン法に基づく軸索伸展シミュレーションプログラムの開発を行った。課題 (3)-(4) の力学・電磁場細胞周辺環境の神経軸索進展への影響の観察結果を踏まえて、細胞周辺環境の影響を考慮した神経軸索伸展解析用のセルラーオートマトン数理モデルの構築を行った。また、多細胞体において細胞の配置が軸索伸展に及ぼす影響の定量的評価を行い、その結果を基に数理モデルの開発を行った。図 1 に示すように、細胞成長因子 (NGF) の効果を考慮し、三次元の軸索伸展および樹状突起との連結を考慮するネットワーク形成のプロセスをシミュレートすることに成功した。

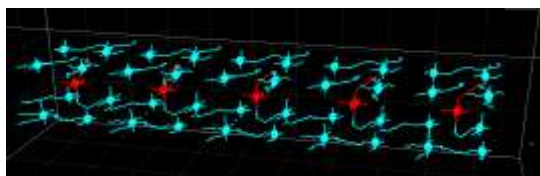


図 1 CA 法によるシミュレーション結果

(2) ラット由来疑似神経細胞 PC12 の軸索伸展の基本メカニズム解明用 Bio-MEMS デバイスの開発を行った。(担当：仲町・森田・博士前後期課程学生各 1 名、協力：南アフリカ Stellenbosch 大学 Dawie van den Heever 博士)：電気泳動法を採用した二次元細胞の捕捉・配置形成 (トラッピング・パターンニング) 用 Bio-MEMS デバイスの作製を行った。中枢神経ネットワークの形態分析により得たユニットセル (RVE Representative Volume Element) を神経様細胞 PC12 細胞体の初期配置モデルとして採用した。二種類のユニットセルの中で最終的には六角形の頂点と中心点に細胞体を配置する実験モデルを選択した。PC12 細胞を等対頂角・等間隔の六角形ユニットセルに配置し、神経成長促進剤 NGF 添加によるネットワーク構築過程を観察し、神経組織生成の支配因子の定量的評価を行った。実験観察結果を図 2 に示す。細胞間距離および相対角度が軸索伸展速度とネットワーク形成に及ぼす影響の定量的評価を行った。これらの実験結果より、セルラーオ

ートマトン手法を用いた神経細胞配置、軸索伸展およびネットワーク形成過程のコンピュータシミュレーションを行い、実験結果との比較により本シミュレーション手法の有効性を確認した。

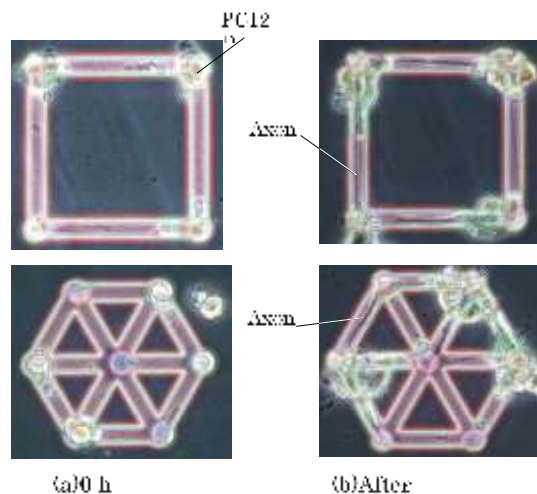


図 2 PC12 軸索伸展ネットワーク形成実験結果 (四角形・六角形の頂点に配置した PC12 の初期および 48 時間経過の観察結果)

(3) 生体適合圧電材料 MSO 多層膜ダイヤモンドによる二次元応力・静電磁場負荷装置の作製と PC12 による軸索伸展観察を行った。(担当：仲町・森田・博士前後期学生各 1 名、協力：南アフリカ Stellenbosch 大学 Dawie van den Heever 博士) 申請者らが発見、開発した生体適合圧電材料 MSO 多層膜をダイヤモンドの上層に成膜することでユニモルフ型ダイヤモンドを作製し、繰返し曲げ応力を負荷することで、繰返し応力・ひずみと電位場刺激が可能なデバイスを創生した。その膜上に PC12 を播種し軸索伸展の状態を観察した。顕微鏡下の観察が可能となるように、MEMS 技術を用いて板薄膜構造の設計・製作を行った。これまでの研究により圧電磁場刺激による軸索伸展の促進効果が顕著でなかったが、本年度はシリコン基板に  $\text{TiO}_2/\text{MSO}$  を成膜したユニモルフ型ダイヤモンドを作製し、繰返し曲げ変形を負荷した際の表面電位を測定した。電位として、最大で 515 mV、最小で -327 mV を生じることが分かった。

以上の結果より、創製したユニモルフ型ダイヤモンドによる引張り・圧縮および電界繰返し負荷が可能であることを確認した。図 3 に MSO 面上に発生する電場を計測した結果を示す。

本装置により二次元面内に播種した PC12 細胞に対して繰返し力学・電界刺激が可能であることが示唆された。

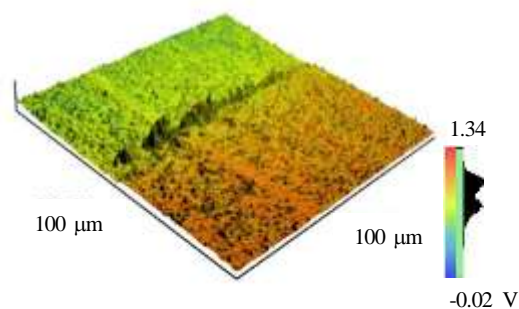


図3 MSOにより誘起された電場分布

(4) ポールピースによる交流電磁場創生デバイス開発と細胞活性実験 (担当: 仲町・森田・博士前後期学生各1名, 協力: 同志社大学理工学部高橋博士) Blackman らのヘルムホルツ磁場発生装置による研究および申請者らのポールピース構造による交流磁場を用いた先行研究により,  $4.2 \mu\text{T}$  の磁場刺激により神経軸索伸展が増大することが確認された. 本研究では, 任意の磁場勾配を持つ交流電磁場環境を創生することで, 電磁場の平均値および勾配値が PC12 細胞の軸索伸展の加速およびの伸展方向の制御を可能とすることを実験検証することを目指した. 二次電場における実験の結果としては, 磁場刺激による軸索伸展速度の増加の効果は確認したが, 磁場勾配による軸索伸展方向の制御の可能性は低いことが示唆された. 以上のことから, 本研究課題では三次元交流電磁場の創生を目指すこととした. ポールピースの設計と PC12 を用いた実験検証を行った. 交流電磁場再生環境を高精度で予測することが可能になると考える.

PC12をコラーゲンゲル内に包埋し, 三次元培養を行った. 細胞懸濁液を混合したコラーゲン溶液に神経成長因子 (NGF) を添加後, 周波数 50 Hz,  $350 \text{ mV}_{\text{p-p}}$  の交流電圧をバイオリアクターに印加することで, 磁束密度  $4.2 \mu\text{T}$  の一様交流磁場を PC12 に負荷した. 培養 7 日後の軸索伸展および神経ネットワーク形成を MPM (Multi Photon Microscope) により  $500 \mu\text{m}$  立方領域を対象として観察した. Control と比較して電磁場刺激の軸索伸展促進効果を確認した. 各画像を基に軸索伸展距離を計測したところ, 電磁場刺激後は Control と比べ  $10.4\%$  の軸索伸展効果を確認した. また, 軸索形成細胞数の割合は, 電磁場刺激後が Control に比べ  $4.2\%$  高かった. 以上のことから, 電磁場刺激が PC12 の軸索形成および軸索伸展の促進効果を有することが示唆された.

(5) 力学・電磁場細胞周辺環境創生デバイスの開発と PC12 軸索伸展最大化探索を行った. 本課題は最終段階の研究課題であり, 本年度は課題 (3), (4) の成果を踏まえて, 力学・電位場および交流電磁場の重合による PC12 細胞の軸索伸展および神経ネットワーク形成の促進を目的とした細胞周辺環境の創生の

ためのデバイス設計と製作を行った. 図 4 に製作したデバイスの写真および PC12 の播種の状態写真を示す.

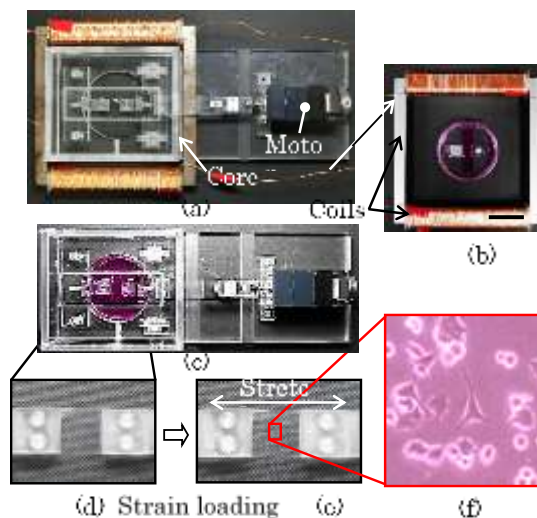


図4 力学・電磁場細胞周辺環境創生デバイスおよび PC12 播種観察写真 (Bar; 30 mm);

(a)ハイブリッドデバイス全体写真, (b) 一様磁場刺激装置, (c) 力学刺激装置, (d)引張り前の状態, (e) 4% 引張りを負荷した状態, (f)PC12 細胞観察写真

培養液に PC12 を混合して作製した細胞懸濁液を  $2.0 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  の播種密度で親水化処理および I 型コラーゲンコーティングを施したシリコンラバー上に播種した. 温度  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  濃度 5%, 湿度 100% のインキュベーター内に 24 時間静置し, 細胞の接着を確認した後, 神経成長因子 (Nerve Growth Factor: NGF 2.5S, 13257-019, Gibco) を  $50 \text{ ng/ml}$  添加した. NGF 添加直後から一様交流磁場刺激および引張りひずみ 4% の力学刺激を開始し, 0, 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 時間後に PC12 の軸索伸展長さおよびネットワーク形成を観察した. Control と比較した結果, 引張刺激下では  $25.2\%$ , 一様磁場刺激下では  $37.4\%$ , 力学・電磁場ハイブリッド刺激下では  $70.0\%$  の軸索伸展促進が確認された. それぞれの軸索伸展過程を比較すると, 培養 0 時間から培養 24 時間後にかけて引張刺激下の PC12 の軸索伸展が顕著に促進されており, 培養 24 時間から培養 96 時間にかけて一様交流磁場刺激下の PC12 の軸索伸展が顕著に促進されていることが確認された. ハイブリッド刺激下においては各刺激下の軸索伸展過程の特徴が同時に確認されており, 軸索伸展促進の相乗効果がある可能性が示唆された.

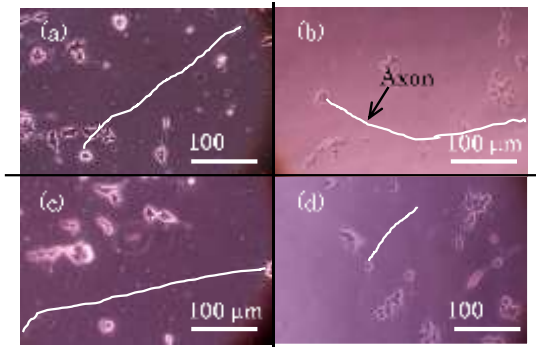


図5 PC12 細胞の軸索伸展の位相差顕微鏡による観察結果 (a) ハイブリッド刺激の場合, (b) 交流電磁場刺激の場合, (c) 力学刺激の場合, (d) コントロールの場合

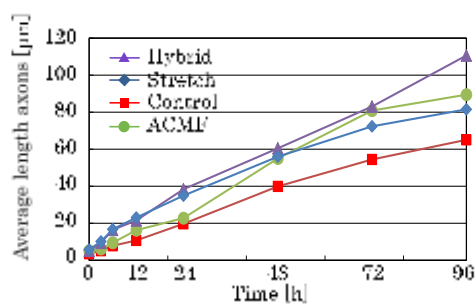


図6 PC12 細胞の軸索伸展長さの時系列変化 (96 時間培養結果)

### 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5件)

1. Fujimoto, Y., Nakamachi, E., Morita, Y., Biocompatible Aurivillius-like layered ferroelectric BaIn<sub>2</sub>Ta<sub>2</sub>O<sub>9</sub>, *Ceramics International*, (2017), pp.1-4, DOI:10.1016/j.ceramint.2017.03.024. 査読有

2. Horii, T., Tsujimoto, H., Miyamoto, H., Yamanaka, K., Tanaka, S., Torii, H., Ozamoto, Y., Takamori, H., Nakamachi, E., Ikada, Y., and Hagiwara, A., Physical and Biological Properties of a Novel Anti-adhesion Material Made of Thermally Cross-linked Gelatin Film: Investigation of the Usefulness as Anti-adhesion Material, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, (2017), pp. 1-8. 査読有  
DOI: 10.1002/jbm.b.33880.

3. Nakamachi, E., Murakami, S., Koga, H. and Morita, Y., Development of a bio-microelectromechanical system device for axonal extension evaluation by PC12D patterning using a dielectrophoresis method, *Journal of Micro/Nanolithography*,

*MEMS, and MOEMS*, Vol. 14(2), (2015), pp. 1-10, DOI: 025004-1-025004-10. 査読有

4. Takaki, T., Nakagawa, K., Morita, Y. and Nakamachi, E., Phase-field modeling for axonal extension of nerve cells, *Mechanical Engineering Journal*, Vol.2, No.3, (2015), pp. 1-12,  
DOI: 10.1299/mej.15-00063. 査読有

5. Nakamachi, E., Yanagimoto, J., Murakami, S. and Morita, Y., Development of microarray device for functional evaluation of PC12D cell axonal extension ability, *Journal of Micro/Nanolithography, MEMS, and MOEMS*, Vol. 13(2), (2014), pp. 1-09, DOI: 023013-1-023013-9. 査読有

[学会発表] (計14件)

1. Saito, T., Morita, Y. and Nakamachi, E., Effect of the Gradient Magnetic Field Stimulation on Extracellular Matrix Synthesis of Chondrocyte, *Proc. of ASME2016, International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Phenix, USA, IMECE2016-66419*, (2016-11-17).

2. Akizawa, Y., Morita, Y., Hsu, Y., Yamaoka, T. and Nakamachi, E., Development of IKVAV Modified PLLA Guide Tube Having Unidirectional Fibers on Inner Surface to Enhance Axonal Extension, *Proc. of ASME2016, International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Phenix, USA, IMECE2016-65458*, (2016-11-17).

3. Matsumoto, K., Morita, Y. and Nakamachi, E., Development of hybrid Electromagnetic and Mechanical Stimulation System for Enhancement of Nerve Axonal Extension, *Proc. of ASME2016, International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Phenix, USA, IMECE2016-65593* (2016-11-16).

4. Kamimori, S., Okuda, R., Morita, Y. and Nakamachi, E., Development of Bio-MEMS Thermal Device to Generate Nerve Axonal Injury Model for Assessment of Regenerative Medicine, *Proc. of ASME2015, International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Houston, USA(2015-11-16)*.

5. Koga, H., Morita, Y. and Nakamachi, E., Development of Dielectrophoresis Aided Cell Patterning Device for Elucidation of Nerve-network Generation Mechanism, *Proc. of Int. Symposium on Advanced Science and Technology in Experimental Mechanics ISEM2016, Ho-Chimin, Vietnam, A0006*, (2016-11-4).

6. Nakayama, A., Yamamoto, T., Morita, Y. and Nakamachi, E., Development of Multi-Layered Cellular Automata Model to Predict Nerve Axonal Extension Process,

Proc. of VI International Conference on Computational Bioengineering (ICCB 2015), Barcelona, Spain, (2015-9-15), pp.1-9.

7. Yoshioka, N., Morita, Y. and Nakamachi, E., Evaluation of Piezoelectric Property by Using First-Principles Calculation of A-Site substitution MgSiO<sub>3</sub> Mixed Crystal, Proc. of IMRS2015, Poster session, Cancun, Mexico(2015-8-18).

8. Fujimoto, Y., Nakamachi, E. and Morita, Y., Molecular Design of New Biocompatible Aurivillius-like Layered Perovskite Ferroelectrics by First-Principle Calculation, Proc. of IMRS2015, Poster session, Proc. of IMRS2015, Poster session, Cancun, Mexico (2015-8-17).

9. Nakayama, A., Miyabe, T., Okuda, R., Yamamoto, T., Morita, Y. and Nakamachi, E., Development of Cellular Automata Simulation Code to Predict Nerve Axonal Extension Considering Extra-Cellular Environmental Stimulation Effects, Proc. Of ASME2014, International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Montreal, Canada, (2014-11-19).

10. Narisada, R., Morita, Y., Katayama, Y. and Nakamachi, E., "Development of PLLA Porous Fiber Scaffold by Electrospinning for Tissue Engineering", ASME 2014 International Mechanical Engineering Congress & Exposition, Montreal, Canada, (2014-11-19).

11. Nakasaki, S., Morita, Y., Katayama, T. and Nakamachi, E., "Fabrication of MgSiO<sub>3</sub> Thin Film by RF Magnetron Sputtering Method to Accelerate Bone Formation", Biomedical Engineering Society 2014 Annual Meeting, San Antonio, USA, (2014-10-25).

12. 村上慎彌, 森田有亮, 仲町英治, PC12D パターニングのための誘電泳動法を用いた Bio-MEMS デバイスの開発, 日本機械学会第6回マイクロナノ工学シンポジウム, 松江市くびきメッセ, 島根, (2014-10-21), pp. 21am2-E2.

13. Yoshioka, N., and Nakamachi, E., "Evaluation of Piezoelectric Property by Using First-Principles Calculations of A-Site Substitution MgSiO<sub>3</sub> Mixed Crystal", "36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society", Chicago, USA, (2014-8-29), p.91.

14. Okuda, O. and Nakamachi, E., "Development of Electromagnetic Stimulation Loading Bio-Reactor for Peripheral Nerve Tissue Regeneration", "36th annual international conference of the IEEE engineering in medicine and biology society", Chicago, USA,

(2014-8-28), poster.

〔図書〕 (計0件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仲町 英治 (NAKAMACHI Eiji)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：60099893

### (2) 研究分担者

萩原 明朗 (HAGIWARA Akeo)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：90198648

### (3) 研究分担者

森田 有亮 (MORITA Yusuke)

同志社大学・生命医科学部・教授

研究者番号：80368141