

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06014

研究課題名(和文)皮下細胞適宜採取のための極低侵襲ウェアラブルシステムの開発

研究課題名(英文) Development of a minimally invasive wearable system for sampling subcutaneous cells intermittently

研究代表者

鶴岡 典子 (Tsuruoka, Noriko)

東北大学・工学研究科・助教

研究者番号：70757632

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)：表皮下の生細胞を適宜採取する極低侵襲な細胞採取デバイスを目指し、超音波照射により皮下組織を極小範囲で破碎し、極細径針を通して細胞を体外に採取するデバイスを作製した。超音波照射機構は、ランジュバン型振動子にホーンを取り付け、その先に細径の注射針を接続することで、針まで超音波を伝搬し、針先周囲の細胞に超音波を照射する構造とし、水中での超音波計測によって針先からの超音波照射を確認した。細胞吸引機構は、吸引経路の途中に細胞トラップを設けた吸引システムを用いることで、吸引した皮下細胞がすぐにトラップ内の細胞保存液に流れ込むため、ポンプへの組織の流れ込みを防止と、実験中の採取した細胞の保護を可能とした。

研究成果の概要(英文)：A minimally invasive cell sampling device which using emulsification of cells by ultrasound irradiation and suction through ultra-thin needle was fabricated. This device enables sampling living cells from subepidermal tissue. The ultrasonic device consists of Langevin transducer, ultrasound horn and jig for needle. Ultrasound produced by Langevin transducer transmitted to ultrasound horn, and focused to jig for needle. It is evaluated that ultrasound was irradiated from needle tip by measuring ultrasound intensity in water. The cell suction device has cell trap in the middle of suction path. This trap prevents inflow of tissues into the pump and protect the collecting cells. If tissues inflow into the pump, pump suction strength will be weakened.

研究分野：医工学

キーワード：超音波 細胞 吸引

1. 研究開始当初の背景

睡眠障害は日本においても一般成人のうち約 21% が不眠に悩んでおり、約 15 % が日中の眠気を自覚しているとの調査結果もある。睡眠不足や睡眠障害が長期間持続すると、生活習慣病やうつ病などになりやすくなることもあり、睡眠障害に適切に対処することが重要である。睡眠障害は体内時計（概日リズム、Circadian rhythm）の乱れが原因で発症するとされており、睡眠障害の診断、治療において概日リズムの把握は非常に有用である。

概日リズムをつかさどる時計遺伝子の発現量は概日リズム周期を示して増減するとされており、検体の時計遺伝子発現を測定し分子時刻表と照らし合わせることで、検体が採取された時間が、体内時刻の何時であるかを正確に知ることができることが証明されている[1]。つまり、その人の概日リズムを把握するには、日常生活の数時間ごとに細胞を採取し、時計遺伝子の発現量を測定することが必要となる。この測定のためには、日常生活中に細胞を適宜採取できるウェアラブルなデバイスが有用である。その他にも、診断や病状の評価に役立つタンパクの発現量を適宜細胞採取により計測することで、今までにない検査・診断につながると期待される。

細胞の採取は一般に血液や口内粘膜で行われることが多いが、これらの方法はウェアラブルな使用が難しいだけでなく、生細胞以外の夾雑物が多いために再現性が高くない。時計遺伝子の発現量の周期（概日リズム）は同一個人であれば採取部位や採取時期が異なってもほぼ同様だが、個人間では異なっていることが示されている[2]。実際に、毛根[3]や皮膚[2]の細胞を採取し時計遺伝子の発現を計測した研究がなされている。

2. 研究の目的

本研究では、皮下の生細胞を適宜採取する極低侵襲な細胞採取デバイスの開発を目指した。例えば用途として、概日リズムの把握のための時計細胞発現量の計測に役立つ。具体的には、組織内細胞を採取する手術で用いられているキューサ（CUSA: Cavitation Ultrasonic Surgical Aspirator）を参考に、超音波照射により皮下組織を極小範囲破碎し、極細針により吸引することにより細胞を体外に採取する。

3. 研究の方法

細胞採取機構の構成

実質臓器の組織や脂肪組織を採取するキューサは、対象組織に超音波振動を与えて破碎・乳化しこれを吸引することで組織を採取する装置である。本研究ではこれまでの研究を踏まえ、このキューサを小型化し時計遺伝

子の発現計測の実績がある皮下細胞の採取に適応することを考えた。皮下からキューサの手法を用いて細胞を採取する際には、確実に皮下の生細胞を採取すること及び超音波による組織の破碎を最小限に抑え極低侵襲で採取することが必要である。

皮下の生細胞を確実に採取するためには、微小な針を表皮のバリアを超えて皮下に刺入・留置する手法を応用することが有用である。これまで、表面に非平面微細加工技術を用いて流路と微小穴付き膜が作製された皮下刺入針を皮膚に刺入し、皮下で微小還流を行うことにより皮下の物資を回収し、皮下に含まれる物質濃度の測定を行ってきた[4]。本手法では皮下に微小な針（外径 200 μm 、長さ 1 mm 程度）を刺入・留置することで、極低侵襲で確実に表皮より下の皮下組織にアプローチできるため、正確な測定が可能である。超音波の照射方法は吸引のために皮下に刺入する針に超音波を伝搬させ針自体を振動させることで針先周囲の組織に超音波を照射する形状とした。本システムの概要図を図 1 に示す。

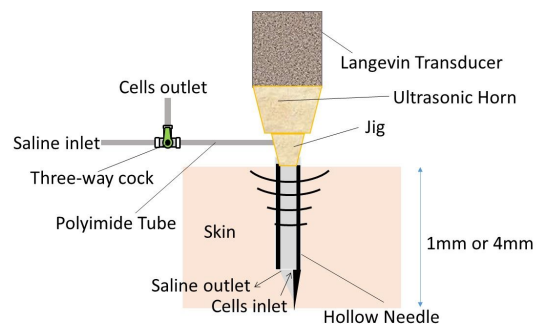


図 1. 細胞採取システムの概要図

細胞吸引システムの作製

細胞採取の際には 30 G（外径約 0.3 mm）以下の注射針を 1~4 mm 皮膚に刺入・留置し、生理食塩水を少量注入する。その後、針を伝搬して表皮下組織に照射された超音波により乳化した細胞を注射針から吸引することで採取する。このとき、吸引に用いるポンプは使い捨てが難しいため、吸引用の針部分は使い捨てに、ポンプは再使用可能とする必要がある。しかし、吸引ポンプに乳化した細胞が入り込むと吸引力が低下し十分な性能を得られない可能性があるだけでなく、次に使用する際にポンプ内の洗浄が必要となるため、吸引経路の途中に細胞トラップを設けた吸引システムを用いた。吸引システムの概要図を図 2 に示す。

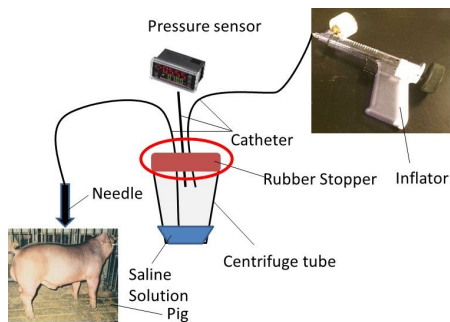


図 2. 吸引システムの概要図

超音波照射デバイスの作製

本研究で用いる超音波はキューサで用いられている周波数を参考に 30~60 kHz とした。周波数が低いことから、超音波振動子にはランジュバン型振動子を用いた。外径 200~300 μm の極細径な注射針に超音波を効率よく伝搬させるため、ランジュバン型振動子の先に真鍮製のホーンを取り付け、その先に注射針を取り付ける構造とした。このとき、皮膚組織に触れる針部分は使い捨てが必要のため、針を保持するための治具をホーンと同じ真鍮で作製し、それをホーンに取り付ける形とした。

超音波照射デバイスの評価

作製した超音波照射デバイスは水中でハイドロフォンにより超音波強度の評価を行った。図 3 のように、水中にハイドロフォンを設置し、吸引用針部分を水に漬けた状態でランジュバン振動子にファンクションジェネレータで発生させた正弦波を電力アンプで増幅した形で印加することにより超音波を発生させた。針先を水に浸した場合だけでなく、針を保持している治具部分を水に浸した場合についても測定を行い、それぞれの部分での損失を確認した。

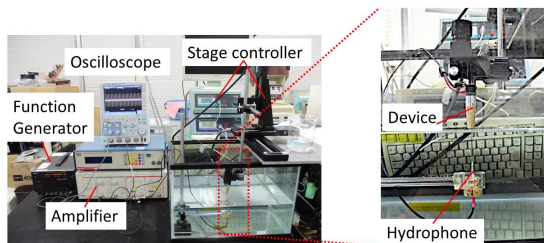


図 3. 超音波計測のセットアップ

ブタ皮膚からの細胞採取実験

作製した吸引装置、超音波照射デバイスを組み合わせ、ブタ摘出皮膚からの細胞採取実験を行った。ブタの鼻部分の皮膚に針を刺入・留置した状態で、生理食塩水を少量注入し、超音波を照射して乳化した細胞を生理食

塩水と一緒に吸引する。本実験では注射針 1 本を使い、流路の途中で 3 方活栓により注入と吸引を切り替えた。始めに超音波照射なしで実験を行い、その後超音波照射を加えて吸引を行った。実験の際に用いたデバイスのを図 4 に示す。

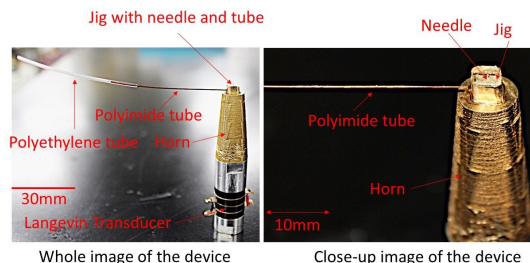


図 4. ブタ皮膚からの細胞採取実験で使用したデバイス

4. 研究成果

細胞吸引システムの作製

作製した細胞吸引システムを図 5 に示す。吸引用注射針に接続したチューブの先端は遠心管に取り付けたゴム栓を通り、あらかじめ入れておいた生理食塩水に浸した。ゴム栓に取り付けたもう 1 本のチューブは遠心管内の生理食塩水に浸らない場所に先端を設置し、もう一方の先端をインデフレータに接続した。これにより、吸引装置であるインデフレータへ採取された細胞が入り込むことを防ぎ、インデフレータ以外の部分を使い捨てにすることを可能とした。

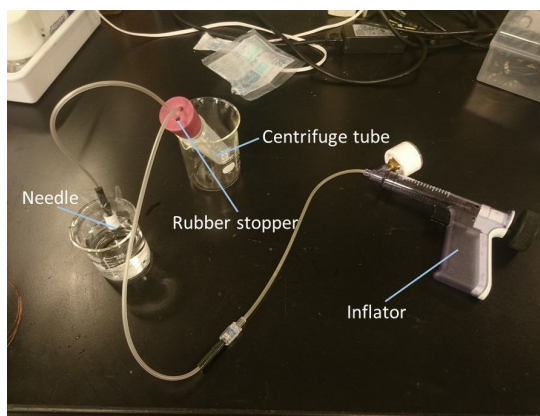


図 5. 作製した細胞吸引システム

超音波照射デバイスの作製

作製した超音波照射デバイスを図 6 に示す。超音波は共振周波数 60 kHz のランジュバン型振動子 (HEC-1560P4B, 本多電子株式会社) を用いた。ホーンの形状は円錐形状のコンカル型とし、上面の大きさをランジュバン型振動子の下面と同じ直径 15 mm とし、下面は針取り付けのための治具の大きさを考慮し直径 9.64 mm とした。このとき共進周波数であ

る 60 kHz に適したホーン長さを計算したところ 29.9 mm となった。

針取り付け用の治具は、溝加工をしたパーツに針とチューブを固定し、平板状のパーツと貼り合わせるにより作製した。

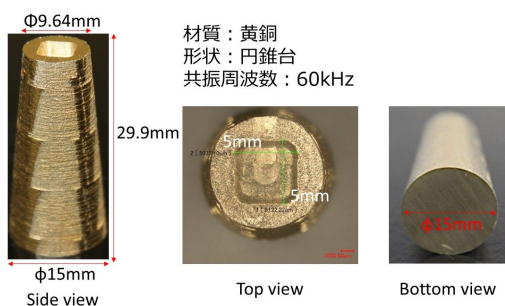


図 6 . 作製した超音波ホーン

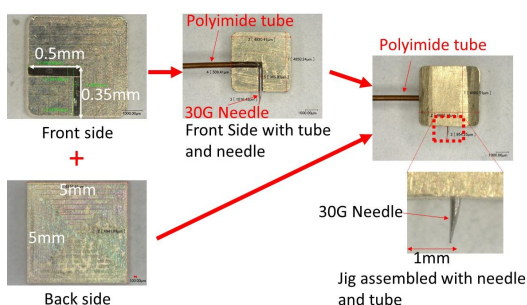


図 7 . 針取り付け用治具の構造と組み立て方法

超音波照射デバイスの評価

作製した超音波照射デバイスの超音波強度をランジュバン型振動子への印加電圧を $21.25 V_{p-p}$ の正弦波に設定し、水中でハイドロフォンにより計測した。治具部分まで水に浸した状態で治具部分からの超音波強度は $3.4 kW/cm^2$ であり、針部分のみ水に浸した場合の針先からの超音波強度は $3.35 W/cm^2$ であった。治具から針への超音波伝搬の際の損失を考慮し、治具部分までは十分に強い強度で超音波を伝搬しているが、針に伝搬する際に超音波強度が $1/1000$ になっておりかなりの損失があるため、今後はこの損失を少なくするための対策が必要である。

ブタ摘出皮膚からの細胞採取実験

ブタ摘出皮膚に作製した吸引用針を刺入・留置した状態で吸引実験を行った。始めに超音波照射がない状態で吸引実験を行ったところ、細胞は吸引されないことを確認した。次に超音波照射を行った状態で細胞吸引を行ったが、この場合も細胞の採取は見られなかった。本実験では、生理食塩水を注入した後に超音波照射を行ってから吸引したが、この時に注入した生理食塩水が組織内を流れて組織下面まで流れてくる現象がみられており、今後は注射針上にもう 1 本流路を設

け注入・吸引を同時に行うことが必要な可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- [1] Hiroki R. Ueda, Wenbin Chen, Yoichi Minami, Sato Honma, Kenichi Honma, Masamitsu Iino, and Seiichi Hashimoto, "Molecular-timetable methods for detection of body time and rhythm disorders from single-time-point genome-wide expression profiles," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol.101, pp. 11227-11232, 2004.
- [2] Steven A Brown, Fabienne Fleury-Olela, Emi Nagoshi, Conrad Hauser, Cristiana Juge, Christophe A Meier, Rachel Chicheportiche, Jean-Michel Dayer, Urs Albrecht, and Ueli Schibler, "The Period Length of Fibroblast Circadian Gene Expression Varies Widely among Human Individuals," PLOS Biology, Vol. 3, pp. 1813-1818, 2005.
- [3] Makoto Akashi, Haruhiko Soma, Takuro Yamamoto, Asuka Tsugitomi, Shiko Yamashita, Takuya Yamamoto, Eisuke Nishida, Akio Yasuda, James K. Liao, and Koichi Node, "Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells," Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 107, pp. 15643-15648, 2010.
- [4] Tsuruoka N, Ishii K, Matsunaga T, Nagatomi R, Haga Y. Lactate and glucose measurement in subepidermal tissue using minimally invasive microperfusion needle. Biomed Microdevices. 2016 Feb;18(1):19. doi: 10.1007/s10544-016-0049-z.

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)

[学会発表](計 1 件)

上地達哉、鶴岡典子、松永忠雄、芳賀洋一、
“極低侵襲表皮下細胞採取デバイスのための超音波照射機構の開発”、日本機械学会東北支部 第 52 期総会・講演会、演題番号 184 (2017 年 3 月、仙台)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

鶴岡 典子 (TSURUOKA, Noriko)
東北大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号：70757632