

令和元年5月31日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10704

研究課題名(和文)酸素ナノバブルを使用した細胞培養および3次元構造物における新たな培養方法の開発

研究課題名(英文) Development of a new culture method for cell culture and three-dimensional structure using oxygen nanobubbles

研究代表者

武岡 陽介 (TAKEOKA, Yosuke)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号：50773868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では当科所有のナノバブル発生機による酸素ナノバブル培養液の作成方法を確立した。また、それを用いて線維芽細胞の増殖実験を行った。培養が促進される群を認めた。ナノバブルの細胞分化への影響を評価する目的に、ナノバブル培養液を用いて、間葉系幹細胞と軟骨細胞を共培養した。その結果、ナノバブル培養群でグリコサミノグリカンが多く含有されることが示唆された。細胞スフェロイドを用いた三次元構造体作成実験に関しては、ラットを用いた移植実験を行うことが可能であり、また、その技術を確立した。ナノバブル技術と三次元構造体作成技術を応用することで人工臓器の安定的な供給に寄与することが可能とすることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年再生医療の発展にもなって目的細胞の安定的な供給方法の開発が急務であるなか、ナノバブルを用いた培養液により人工臓器における、迅速な増殖、分化を誘導させる新たな培養液の開発を目指していた。本研究では一部、ナノバブルの細胞増殖効果を認めた。今後、ナノバブルは細胞培養をより迅速に可能とする手段の一つとなりうる可能性を見出した。このことは再生医療をより効率化していくうえでプラスの影響となると考える。今後はより多くの条件、気体の種類などでの実験をつづけ、再現性の高いものを選択していく必要があると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we established a method for producing oxygen nanobubble culture solution using our own nanobubble generator. In addition, proliferation experiments of fibroblasts were performed using it. There was a group in which the culture was promoted. In order to evaluate the influence of nanobubbles on cell differentiation, mesenchymal stem cells and chondrocytes were cocultured using nanobubble culture solution. As a result, it was suggested that a large amount of glycosaminoglycan is contained in the nanobubble culture group. As for the three-dimensional structure preparation experiment using a cell spheroid, it is possible to conduct a transplant experiment using a rat, and the technique was established. It is expected that it will be possible to contribute to the stable supply of artificial organs by applying the nano bubble technology and the three-dimensional structure creation technology.

研究分野：医学 生物工学 生化学

キーワード：細胞培養 ナノバブル 人工臓器

## 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、マイクロバブル、ナノバブルの概念が定着してきており、ナノバブルを精製する技術が進化しているが、医療分野で実用段階に至るまでの報告は未だあげられていない。その理由としてはその大きさからもナノバブルの実態に関して未だ不明な点が多いことが原因と考えられる。当科の所有しているナノバブル発生装置は気泡剪断法を用いて精製しており、精製後約3ヶ月経過しても約2割しか減少せず、高密度が保たれている事が証明されている。1mlあたり約10億個のナノバブルの高密度を精製できるのは日本国内では当装置のみである。また、このバブルには、酸素、窒素、二酸化炭素、オゾンなどさまざまな気体を封じ込めることができ、液体中に長く留めることができる。このことにより、それぞれの気体をより高濃度に、長く留めることで、その効果を高く、持続されることができる。これを用いた実用化された例として、酸素ナノバブルがある。酸素ナノバブル水を用いて育成した魚は、通常の水で育成された魚の1.5倍の大きさになることがわかっており、すでに実用化されている。一方で、再生医療において、人工臓器、スキャフォールドの再細胞化など、細胞を大量に必要とする研究が盛んに行われるようになってきた。しかし、このような研究においては、これまでの細胞培養では、時間と人力が大量に必要となり、研究が思うように進まなかった。この解決方法として、細胞培養のオートメーション化が試みられているが、コスト、スペースなどの面でまだ時間を要する。このような背景から、すでに魚などで生物の増大、増殖に実績のある、酸素ナノバブル水を培養に用いることで、細胞、組織の培養を迅速、低コスト、省スペースで行え、これまでの問題を解決できる新たな培養液の開発を試みる。

### 2. 研究の目的

酸素ナノバブル(高濃度酸素水)を使用した細胞培養および3次元構造物(Scaffold-free人工臓器)における新たな培養方法の開発《全体構想》当科の所有するナノバブル発生装置で精製した高濃度酸素水は、魚の成長を倍増させる効果がある。これを細胞培養、組織培養に応用し、とくに人工臓器における、迅速な増殖、分化を誘導させる新たな培養液の開発を行う。《具体的構想》(1)これまでの培養液を、ナノバブル発生装置にいれ、高濃度酸素ナノバブル培養液を作製する。(2)酸素ナノバブル化したそれぞれの細胞用培養液を線維芽細胞、気管支上皮細胞、平滑筋細胞、間葉系幹細胞、iPS細胞に使用し、増殖、分化、について評価する。変化が見られた場合は、遺伝子変化について、マイクロアレイを用いて、解析する。(3)我々が行っているScaffold-free人工臓器(気管、食道、血管)について、その増殖、分化、強度、成熟のスピードについて評価する。

### 3. 研究の方法

当科の所有するナノバブル発生装置で精製した高濃度酸素水は、魚の成長を倍増させる効果がある。これを細胞培養、組織培養に応用し、とくに人工臓器における、迅速な増殖、分化を誘導させる新たな培養液の開発を行う。

(1)これまでの培養液を、ナノバブル発生装置にいれ、高濃度酸素、窒素、二酸化炭素ナノバブル培養液を作製方法を確立した。

(2)酸素ナノバブル化したそれぞれの細胞用培養液を線維芽細胞を用いて評価を行った。間葉系幹細胞、増殖、分化、について評価した。

(3)ナノバブル培養液の細胞分化を評価する方法としてヒト間葉系幹細胞、ヒト関節軟骨細胞を単独または共培養した条件で三次元培養をナノバブル化培地、非ナノバブル培地をそれぞれ用いて行い関節軟骨が分泌するグリコサミノグリカン(GAG)の量を測定した。

### 4. 研究成果

(1)培養液をそれぞれ作成し浮遊細胞が接着し細胞増殖が行われることをそれぞれの培地で確認した。

(2)線維芽細胞の増殖をMTTアッセイにて評価を行った。ナノバブル化培地群で増殖が促進された群を認めた。

(3)各群3次元培養は可能でありスフェロイドを形成した。形成したスフェロイドをGAGアッセイをもちいて評価を行ったところナノバブル群でGAG産生量が多く認められていた。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0件)

追加実験のうへで論文化の予定である。

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：松本 桂太郎  
ローマ字氏名：MATSUMOTO, Keitaro  
所属研究機関名：長崎大学  
部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：80404268

研究分担者氏名：谷口 大輔  
ローマ字氏名：TANIGUCHI, Daisuke  
所属研究機関名：長崎大学  
部局名：病院（医学系）  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：20773758

研究分担者氏名：馬場 雅之  
ローマ字氏名：BABA, Masayuki  
所属研究機関名：長崎大学  
部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）  
職名：研究協力員  
研究者番号（8桁）：90771957

研究分担者氏名：永安 武  
ローマ字氏名：NAGAYASU, Takeshi  
所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科（医学系）

職名：教授

研究者番号（8桁）：80284686

(2)研究協力者 なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。