

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19360106
 研究課題名(和文) 3次元動的マイクロ力学刺激を用いる損傷細胞組織の
 アクティブ力学操作・再生治療法
 研究課題名(英文) Active dynamic manipulation and regenerative technique for damaged
 cells by using 3-D micro dynamic stimulation
 研究代表者
 小沢田 正 (KOSAWADA TADASHI)
 山形大学・大学院理工学研究科・教授
 研究者番号：10143083

研究成果の概要(和文)：

piezoelectric elements were used to develop a micro-actuator-sensor device. The device consists of a sensor and an actuator. The sensor is a cantilever beam with a piezoelectric layer on its surface. The actuator is a piezoelectric layer on a substrate. The device was used to induce mechanical local stimulation and to detect local mechanical cellular response. Then, an experimental system was established for cultured adhesive cells. The developed micro device has potentials as not only a sensor to evaluate local mechanical property but also as an actuator to enforce mechanical local stimulation onto cultured living adhesive cells. The method has shown that the importance and effectiveness of the mechanical stimulations upon cellular activity particularly in the aspect of regenerative technique.

研究成果の概要(英文)：

A new micro actuator-sensor device was developed to induce mechanical local stimulation and to detect local mechanical cellular response. Then, an experimental system was established for cultured adhesive cells. The developed micro device has potentials as not only a sensor to evaluate local mechanical property but also as an actuator to enforce mechanical local stimulation onto cultured living adhesive cells. The method has shown that the importance and effectiveness of the mechanical stimulations upon cellular activity particularly in the aspect of regenerative technique.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2009年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・機械力学・制御

キーワード：細胞，動的力学刺激，3次元センサ・アクチュエータ，培養ヒト骨芽細胞，
 蛍光観察，ストレスファイバー制御，細胞活性化

1. 研究開始当初の背景

1) 損傷細胞・組織の再生回復手法の開発

は，再生医療の格段の進展に必要不可欠な
 基幹技術であり，マイクロ，サブマイクロ

マニピュレーション技術および細胞・組織培養技術の普及に伴い，国内外で急速に活発化して来ている。

2) 少子化，高齢出産化が急激に進行する近年，人口減少対策は我国の国力の将来を左右する重大な案件であり，種々の施策が講じられている。その一端を担う不妊治療の手段として体外受精，顕微授精技術は必要不可欠なものとなりつつあり，その安全性，確実性の確立は急務である。また，受精卵から細胞質を一部採取して遺伝病等の診断を行う技術も開発されている。しかし，これらの操作による受精卵のローカルダメージの影響を最小限に止めて回復を促進させ，受胎率，生存率を格段に高める手法はいまだ未開発である。また，この再生回復手法の神経細胞への応用は，これまで医学的には不可能とされてきた脊髄損傷治療への新たな窓口を開くことにもつながる点で大いに注目されている。

3) 現在，AFM などを利用した細胞の形態や挙動に関する研究が多数試みられているが，生きている細胞・組織に対するスピーディな動的操作が難しい，卵細胞，軟骨細胞など浮遊細胞への適用が困難である，高額な装置を必要とするなどの難点がある。生きている微細で繊細な細胞・組織に対する動的力学刺激の有用性については従来から指摘されつつも，これを実現し得る有力な手段は未だ見出されていない。本研究はこの分野での，全く新たな手法の提言をめざしている。

2. 研究の目的

1) 生命の最小単位は細胞であり，その生死は臓器の不全のみならず，最終的には個々の生命体の健康・生死，ひいては種の存亡に直結する場合もあり，各方面から注目されている。特に，事故，疾病あるいは種々の治療操作などによって損傷した細

胞あるいは組織の再生回復メカニズムの解明および再生治療の具体的手法の開発は，医学的重要性から焦眉の急である。もし，損傷した細胞・組織の安全で確実な再生治療法が実現されれば，医学分野のみならず，生命科学の各分野に，計り知れないインパクトをもたらすものと考えられる。

2) 生体細胞は外界から何らかの刺激を受けると，防衛，適応，情報伝達等の機能発現のために膜張力の変化，細胞内の応力分布や外力に対する変形能の変化，細胞自身の移動などの力学的現象を呈する。一方，適度な力学的刺激は細胞の持つ潜在的再生能力を助長して，細胞さらには組織の損傷回復を促す可能性があることが指摘されている。

3) そこで本研究では，生きている細胞・組織の内部力学状態を外部から無侵襲で計測・モニターし，かつ細胞の増殖，分化などの活性化を促進する最適な力学刺激を付加・コントロールし得る革新的マイクロデバイスの構築およびこれを用いた再生治療技術の開発をめざす。

3. 研究の方法

1) ピエゾマイクロ振動センサー・3次元アクチュエータ複合デバイスシステムの構築： 図1はセンサー・アクチュエータ部の機構概略である。ピエゾ素子を利用した微小振動子とこれに付随するマイクロ触覚プローブから成るシンプルな構造を有している。センサー振動子先端のプローブを被測定体に接触させた場合の振動子のインパルス応答を高精度に測定することにより，被測定体の固有振動数，弾性係数，粘性減衰係数などの動的力学特性を定量的に評価することができる。一方アクチュエータは，立体ダブルL型カンチレバー状に加工した振動子に，直交3軸方向それぞれ

れの変位が制御できるように3枚のピエゾ素子を接着し製作する。これらのピエゾ素子に任意の信号を入力することによりアクチュエータ先端の変位を高精度に制御でき、3次元的に自由なアクチュエーションが可能となる。また、任意の振動数で励振させることも可能である。本センサー・アクチュエータ複合デバイスを、高精度マイクロマニピュレータ・倒立型位相差顕微鏡に組み込むことによりシステム構築を行う。次いで、力学物性が既知のシリコンマイクロゴムブロックを用いたデバイスの精度検証を行う。

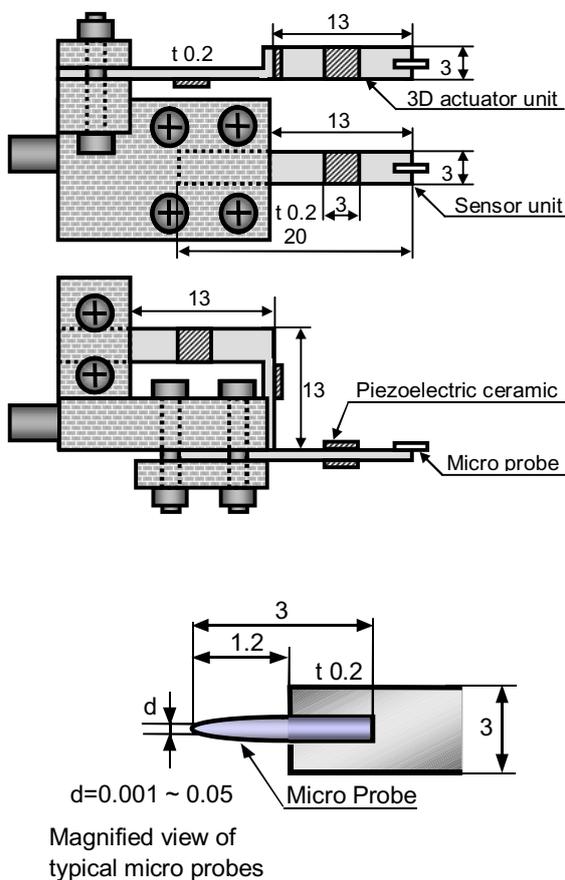


図1 センサー・アクチュエータ機構

2) 卵細胞を用いた損傷の回復評価検証：第一段階として、被験体はヒトと同等の生命機能を有するとされるメダカの受精卵細胞

胞を用い、実際の人工授精あるいは遺伝子診断のための胚生検操作を想定し、これと全く同様の処置・操作を施す。先端直径数 μm の極細ガラスニードルで卵細胞の一点を数 μm 程度穿刺してローカルな損傷を付与する。一定時間後、卵細胞に3次元マイクロアクチュエータを用いて動的力学刺激を付加する。次に、マイクロセンサーを用い、損傷の回復度を卵細胞の力学的コンプライアンス（やわらかさ）から定量的に評価検証する手法の開発をめざす。

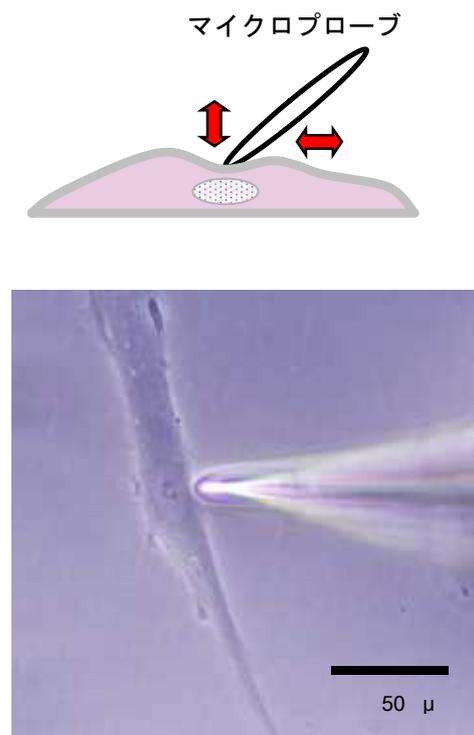


図2 3次元アクチュエータによる圧縮、せん断、振動刺激（上：概念図、下：ヒト骨芽細胞の刺激状況顕微鏡写真）

3) ヒト骨芽細胞の活性化促進および損傷の回復評価検証：第二に、力学刺激に敏感とされるヒト骨芽細胞を被験体として用いる。図2に示すようにセンサー・アクチュエータデバイスにより圧縮、せん断、振動など基礎的力学刺激に対する応答を、細胞の力学的コンプライアンスおよび遺伝

子導入トランスフェクション法を用いた蛍光観察によるアクチンフィラメントの挙動と構造から定量的に評価する。さらに細胞の活性化に最適な3次元動的マイクロ力学刺激の探索を行う。これらの知見に基づき、マイクロニードルによる細胞膜スクラッチ、穿刺などのローカルダメージからの再生回復を試みる。なお本実験では、インフォームドコンセント下で採取され所定の検査を経たヒト正常細胞（米国、Cambrex社より入手予定）を用いる。

4) 生体細胞の内部力学状態計測法と損傷再生治療システムの確立：以上の研究を総括し、第一に生きている正常細胞、損傷細胞の「応力」、「やわらかさ」など内部力学状態関連パラメータの同定法およびマイクロ3次元動的力学刺激に対する細胞の応答計測法を構築する。第二にこれらの手法により得られた実験結果を画像データを含めデータベース化し、生体細胞の生命状態の評価指標としての内部力学状態計測システムを確立する。さらに損傷細胞の回復、再生促進を促す最適な刺激の形態、方向、ひずみ量、周波数、インターバル、総量に基づくアクティブ力学操作指針を確立し、損傷治療システムとしての完成をめざす。

4. 研究成果

piezoelectric素子を利用した微小振動子とこれに付随するマイクロ触覚プローブから成るシンプルな構造を有するセンサー、および立体ダブルL型カンチレバー状に加工した振動子に、直交3軸方向それぞれの変位が制御できるように複数のpiezoelectric素子を接着し製作した3次元アクチュエータおよびそのコントローラーを開発した。本センサー・アクチュエータ複合デバイス

を、高精度マイクロマニピュレータ・倒立型位相差顕微鏡に組み込むことによりシステム構築を行った。

第一に損傷細胞の回復（生存率で仮評価）に及ぼす動的力学刺激の影響を評価した。図3はメダカ受精卵を用いた実験の結果である。損傷が重度の場合、動的力学刺激により生存率が約20%改善されることが確認された。

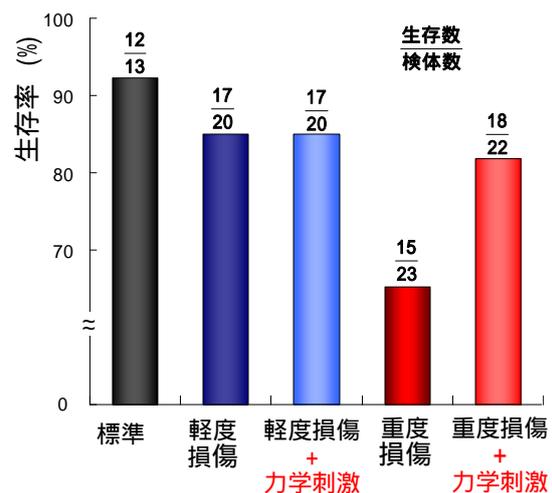
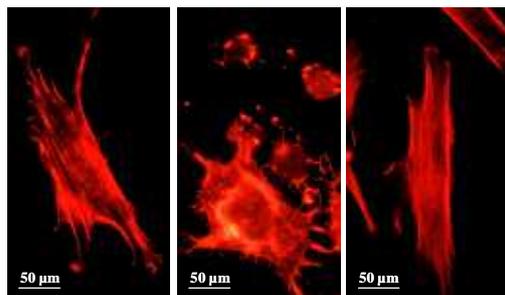


図3 損傷卵細胞の回復に及ぼす動的力学刺激の影響

第二に Cytochalasin D を利用して生細胞の細胞骨格であるストレスファイバー量を制御し、その力学特性への影響を評価する手法を確立した。(図4) このシステムを利用し、種々の条件下において、力学刺激に対する細胞の力学応答を評価する実験をおこなった。その結果、1) 開発したセンサー・アクチュエータは、局所的細胞骨格強度をコンプライアンス(やわらかさ)として評価する能力を有していることを確認した。2) 細胞は、単に入力した力学刺激を画一的な刺激情報として感知するのではなく、力学刺激の種類(静的、動的)を感知できる機構を備えていることが

わかった。(図5参照)3)G-アクチン濃度が高く平衡状態に達していない細胞の場合,ストレスファイバー量が多い細胞の方が力学刺激に対する応答が大きくなる結果を得た。すなわち,ストレスファイバー量は細胞が示す力学応答に大きく関与していると考えられる。4)蛍光染色による細胞内部構造観察を行い,力学刺激との関連を投影面積およびスレンダーネスレシオにより定量的に評価可能であることを確認した。



(a)Control (b)0min. (c)40min.
図4 骨芽細胞アクチンファイバー構造の再重合時間による再構築状況の蛍光画像

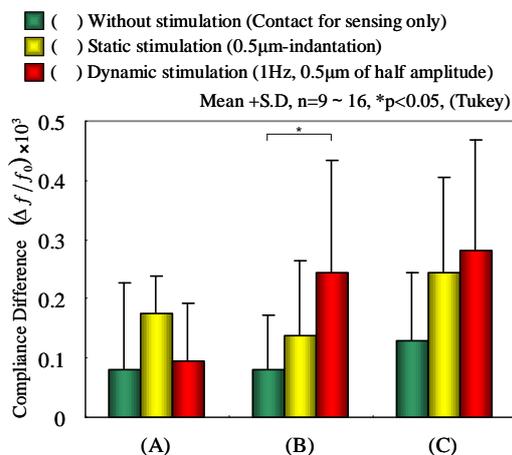


図5 骨芽細胞骨格構造と力学刺激に対する反応, (A) Control (Cytochalasin D-untreated), (B) At 5min. after the Cytochalasin D-removed, (C) At 40min. after the Cytochalasin D-removed.

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6件)

K.Konno, T.Kosawada, M.Suzuki, T.Nakamura, Z.Feng, Y.Hozumi, K.Goto, Dynamic actuation and sensing micro-device for mechanical response of cultured adhesive cells, *Microsystem Technologies*, Vol.16, No.6, pp.993-1000(2010), 査読有

Tadashi KOSAWADA: Active manipulation and recovery assisting system for damaged cells and tissues by the aid of three-dimensional micro dynamic stimulations, *Research Papers of The Suzuken Memorial Foundation*, Vol.26, pp.91-98(2009). 査読無

小沢田 正, 中村孝夫, 後藤 薫, 馮忠剛: 圧電マイクロ3次元振動デバイスによる生体細胞の内部ストレス計測と損傷治療法, *Nakatani Foundation of Electronic Measuring Technology Advancement Annual Report*, Vol.23, pp. 30-41(2009). 査読無

Ken-ichi KONNO, Tadashi KOSAWADA, Hiroshi YAMAZAKI, Yasukazu HOZUMI and Kaoru GOTO: Development of Three-Dimensional Micro Vibration Stage and Its Application to Control device for Cell Culture, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol. 3, No. 1, pp. 38-49 (2008). 査読有

Ken-ichi Konno, Tadashi KOSAWADA, Naoki Endo and Ryouta Sasaki: "Recovery Assisting System for Locally Damaged Egg Cell by Using Three-Dimensional Micro Vibration Devices", *Proceedings of the 12th Asia Pacific Vibration Conference*, Sapporo, OS02-2-1, 12pp. in CD-ROM, (2007). 査読有

Tadashi KOSAWADA, S. Sasaki, Y. Kashiwazaki, Z. Feng, T. Nakamura: Parallel Cantilever Beam Vibrator System for Identification of Dynamic Properties of Biological Soft Tissue, *Proceedings of the 12th Asia Pacific Vibration Conference*, Sapporo, OS02-2-3, 12pp. in CD-ROM, (2007). 査読有

[学会発表](計18件)

中村健, 鈴木雅人, 今野健一, 馮忠剛, 小沢田 正: 骨芽細胞のストレスファイバー制御と動的力学刺激の影響評価, *日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2009*, CD-ROM, No. 237, 6 pp. (2009.8.6). 札幌

佐藤 亮太, 今野 健一, 小沢田 正, 後藤 薫: 3次元振動ステージによる細胞培養コントロールデバイスの開発, *日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2009*,

CD-ROM, No. 238, 6 pp. (2009.8.6).札幌.

石澤尚大, 小沢田 正: 血管内皮細胞貫通チャンネルの形成と物質輸送シミュレーション, 日本機械学会年次大会 2009, No. 09-1, pp.5-6 (2009.9.14),盛岡.

中村健, 鈴木雅人, 今野健一, 馮忠剛, 小沢田 正: 細胞骨格構造の制御と動的力学刺激に対する応答評価, 日本機械学会年次大会 2009, No.09-1, pp.203-204 (2009.9.14),盛岡.

今野 健一, 佐藤 亮太, 小沢田 正, 後藤 薫: 3次元振動ステージを用いた培養細胞への力学刺激付加システム, 日本機械学会年次大会 2009, No.09-1, pp.13-14 (2009.9.14),盛岡.

鈴木雅人, 中村健, 今野健一, 馮忠剛, 小沢田 正: 培養ヒト骨芽細胞に対する動的力学刺激付加マイクロデバイスの開発, 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2008, CD-ROM, No. 338, 6 pp. (2008.9.3),横浜.

佐藤 亮太, 今野 健一, 小沢田 正, 八月朔日 泰和, 後藤 薫: 3次元マイクロ力学刺激を用いる細胞の培養コントロールシステム, 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2008, CD-ROM, No. 341, 6 pp. (2008.9.3),横浜

中村健, 小沢田 正, 鈴木雅人, 今野健一, 馮忠剛: 動的マイクロ力学刺激を用いたヒト骨芽細胞の操作・培養コントロール, 第51回自動制御連合講演会, CD-ROM, No.328, 6 pp. (2008.11.23),米沢.

五代聡也, 石澤尚大, 小沢田 正: 細胞内小胞の形成と膜動輸送に及ぼすダイアフラムの影響, 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2008, CD-ROM, No.336, 6pp. (2008.9.3),横浜

石澤尚大, 小沢田 正, 五代聡也: 血管内皮細胞貫通チャンネルによる物質輸送・制御の解析とシミュレーション, 第51回自動制御連合講演会, CD-ROM, No. 329, 4pp. (2008.11.23),米沢.

今野 健一, 小沢田 正, 佐藤 亮太, 八月朔日 泰和, 後藤 薫: 超小型3次元振動ステージを用いた培養細胞への力学刺激付加システム, 第51回自動制御連合講演会, CD-ROM, No.327, 6 pp. (2008.11.23),米沢.

小沢田 正, 大内 輔: 単一浮遊細胞内小胞の変形と周辺流れのメカニクス, 日本機械学会東北支部第43期総会・講演会論文集 No.2008-1, pp.125-126. (2008.3.15), 仙台.

Ken-ichi Konno, Tadashi KOSAWADA, Naoki Endo and Ryouta Sasaki: "Recovery Assisting System for Locally Damaged Egg Cell by Using Three-Dimensional Micro Vibration Devices", 12th Asia Pacific Vibration Conference, Sapporo, OS02-2-1, 12pp. in CD-ROM, (2007.8.7).

Tadashi KOSAWADA, S. Sasaki, Y. Kashiwazaki, Z. Feng, T. Nakamura: Parallel Cantilever Beam Vibrator System for

Identification of Dynamic Properties of Biological Soft Tissue, 12th Asia Pacific Vibration Conference, Sapporo, OS02-2-3, 12pp. in CD-ROM, (2007.8.7).

今野健一, 磯谷篤志, 荒井孝, 小沢田 正: 培養ヒト骨芽細胞に対する動的力学刺激付加マイクロデバイスの開発, 日本機械学会第19回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集 No.06-65 pp24-25 (2007.1.7),仙台.

今野 健一, 山崎 浩, 小沢田 正, 八月朔日 泰和, 後藤 薫: 超小型3次元振動ステージを用いた細胞培養コントロールシステム, 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2007, CD-ROM, No.235, 6pp. (2007.9.28),広島.

小沢田 正, 小川 聖志, 木村 孝太: 血管内皮細胞チャンネルのダイナミクスと膜動輸送のシミュレーション, 日本機械学会 Dynamics and Design Conference 2007, CD-ROM, No.237, 6pp. (2007.9.28),広島.

今野健一, 遠藤直樹, 佐々木亮太, 小沢田 正: マイクロ3次元振動アクチュエータの開発と受精卵細胞のローカルダメージ再生回復促進法への応用, 日本機械学会第19回バイオエンジニアリング講演会 講演論文集, No.06-65, pp.22-23, (2007.1.7),仙台.

【その他】

ホームページ等

http://kosawada_lab.yz.yamagata-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小沢田 正 (KOSAWADA TADASHI)

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 10143083

(2) 研究分担者

馮 忠剛 (FENG ZHONGGANG)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号: 10332545 (H19 H20 連携研究者)

後藤 薫 (GOTOU KAORU)

山形大学・医学部・教授

研究者番号: 30234975 (H19 H20 連携研究者)