

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501
 研究種目：基盤研究(C)（一般）
 研究期間：2019～2021
 課題番号：19K04273
 研究課題名（和文）骨再生における微小振動効果を細胞スケールで解明する細胞振動MEMSアレイデバイス

研究課題名（英文）Development of MEMS array device vibrating cell for elucidating a micro vibration effect in the bone reproduction on a cell scale.

研究代表者
 南 和幸（Minami, Kazuyuki）
 山口大学・大学院創成科学研究科・教授

研究者番号：00229759

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：振動に対する細胞のメカノセンシング機構を解明するために、顕微鏡観察下で接着細胞に振動刺激を与えられる振動微小ステージを多数配列させた細胞振動マイクロアレイデバイスを開発した。ピエゾ駆動の針を用いてデバイスの振動微小ステージを振動させ、高速度カメラにより顕微鏡観察することで、駆動特性の評価を行った。周波数15Hzの全振幅220 μm、周波数90Hzの全振幅15 μmなどの条件で振動を与えたところ、振動微小ステージは針の動きに追従し直線運動することを確認したので、細胞に対して安定した振動刺激を与える機能を有していると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人体に振動を与える全身振動療法により骨形成が促進されることが明らかになっているが、そのメカニズムは明らかでは無い。先行研究により微小振動が骨形成を促進するメカニズムには細胞が関与していると考えられており、細胞の振動感知メカニズムおよびその解明手法を明らかにすることが必要である。本研究成果は、微小振動下にある細胞の振動感知メカニズムの解明手法を提供することにつながり、将来的には効果的な全身振動療法の実現や骨粗鬆症の治療薬の開発に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：It is known that the cells responses to external mechanical stimulation. Although the effectiveness of vibration stimulation for the osteoanagenesis has been reported, the clarification of detail mechanism for this phenomena is insufficient. In this study, a cell vibration micro array device has been developed to evaluate the cell dynamics and responses to vibration. The device has array of moving micro stages which have transparent thin film for enabling to observe the cell responses to vibration stimulation by optical microscope. The micro moving stages are moved with a needle actuated by piezo actuator. Microfabrication processes, such as a conventional photolithography, lift-off, and sacrificial layer etching, were used for fabricating the device. It was confirmed that fabricated micro stage could be vibrated at the acceleration amplitude of 0.1 and 0.2 G with 15, 45, and 90 Hz.

研究分野：微小生体機械学

キーワード：微小振動 マイクロデバイス Bio MEMS メカノバイオロジー 骨形成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢化社会を迎え、高齢に伴う極めて遅い骨代謝が、骨折や骨粗鬆症の原因となって骨折リスクを高めている。これを改善する方法として、振動プレートを備えたトレーニング機器上で、所定の時間だけ立つ、座る等の姿勢を保つ全身振動療法 (Whole-Body Vibration Therapy) と呼ばれる療法がある。先行研究では、筋力の維持・増加には効果があるとの報告が多いが、骨粗鬆症の防止や骨密度の増加に関しては、未だ評価は定まっていない。しかし、動物実験により微小振動は骨形成に効果があることが分かってきており、骨形成メカニズムとそれに必要な振動条件の解明が期待されている。

(2) 骨基質をほとんど変形させない 1×10^{-6} 以下の歪みの微小な機械振動がどのように骨形成に影響を与えているか、細胞はどのように微小振動を検知しているか、を明らかにする必要があるが、有効な解明手法が明らかではなかった。

2. 研究の目的

細胞が微小振動を検知するメカニズムを解明する実験手法の実現のため、本研究では以下の3項目を研究目的とした。

- (1) 振動を与えている単一細胞の細胞小器官を、光学顕微鏡により高い時間・空間分解能でその場観察できる細胞振動刺激マイクロアレイデバイス(細胞振動 MEMS アレイデバイス)を開発する。
- (2) 振動刺激を受ける培養細胞の細胞小器官の動態の観察手法を開発する。
- (3) 細胞振動 MEMS アレイデバイスで振動させる培養細胞の細胞小器官の動態観察により有用性を実証する。

3. 研究の方法

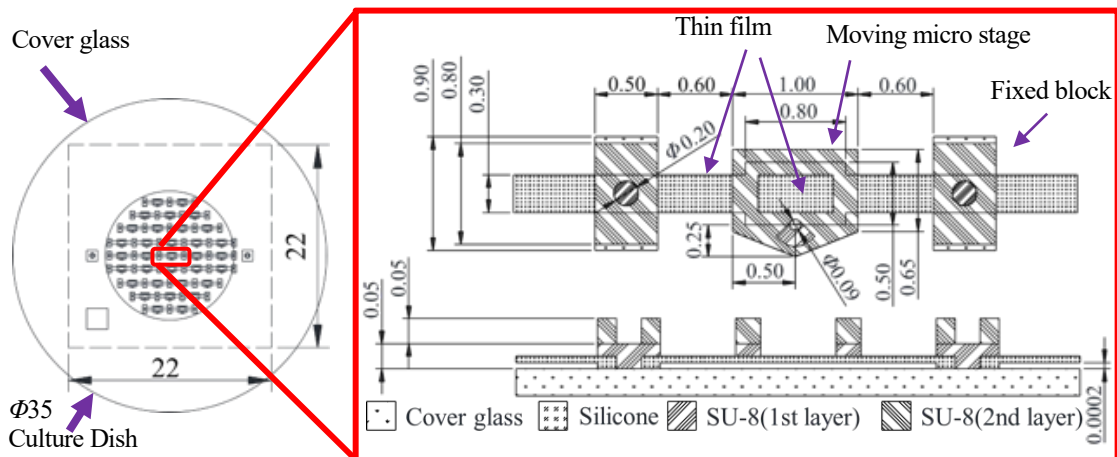
細胞が微小振動を検知するメカニズムを解明する実験手法の実現のため、本研究では本申請者らが開発に成功した独自の細胞ストレッチ MEMS アレイデバイスとそれを用いた観察手法を発展させて、細胞振動刺激マイクロアレイデバイスを開発し、開発したデバイスにより微小振動下の振動特性と顕微観察特性を検討した。細胞振動刺激マイクロアレイデバイスは以下の特徴を持つように設計、試作した。

- (1) 細胞に振動刺激を与える振動微小ステージの光透過性が良く、観察光軸と垂直方向に振動するため振動中でも細胞にピン트가合うので、振動下のその場観察が可能であり、かつ蛍光観察も可能である。
- (2) 振動微小ステージが互いに独立して多数配列しているため、遺伝子導入を用いた実験において遺伝子の発現率が低くても、対象となる細胞を確実に捕捉して実験を行える事に加え、1つのディッシュで多数の細胞の独立した実験条件によるデータを得ることが出来る。
- (3) 振動させる質量を最小化して、実験観察系の不要な振動を抑制して、正確な振動振幅の付与と分解能が高く鮮明な観察ができる。

4. 研究成果

(1) 細胞振動刺激マイクロアレイデバイスの設計、試作

本研究で提案する細胞振動刺激マイクロアレイデバイスの概念図を図1に示す。



(a) Micro array device (Top of view) (b) Enlarged view of moving micro stage for stimulation

図1 細胞振動刺激マイクロアレイデバイス

図 1 (a) はアレイデバイス全体図であり、図 1 (b) は振動微小ステージ部分の拡大図である。図 1 (a) に示すように、提案するデバイスには、細胞培養ディッシュの底に貼り付けられたカバーガラス上に 33 個の細胞培養用振動微小ステージが配置されている。図 1 (b) の振動微小ステージは、細胞の接着領域となる透明薄膜シリコン部と、それを囲む厚膜レジスト SU-8 (日本化薬 (株)) 製の剛体枠部、およびプローブ当て部から構成されている。カバーガラスと接合させた固定部は、薄膜シリコンの梁によって振動微小ステージと繋がれており、振動微小ステージを弾性支持する機能を担っている。図 1 (b) に示すように、針を挿入する孔の 1 段目を真円、2 段目を扇形として、構造内に段差をつけて針の保持性を良くした。

図 2 に細胞に振動刺激を与える際の振動微小ステージの駆動方法を示す。図 2 (a) が駆動前の振動微小ステージである。針による駆動は、図 2 (a) のように SU-8 構造体の振動微小ステージに針を接触させ、図 2 (b) のようにシリコン梁の長手方向に対して垂直方向に変位させる。針の駆動により振動微小ステージを図 2 (a) と図 2 (b) の状態を往復させることで、振動微小ステージに接着した細胞に振動刺激を与える仕組みとなっている。

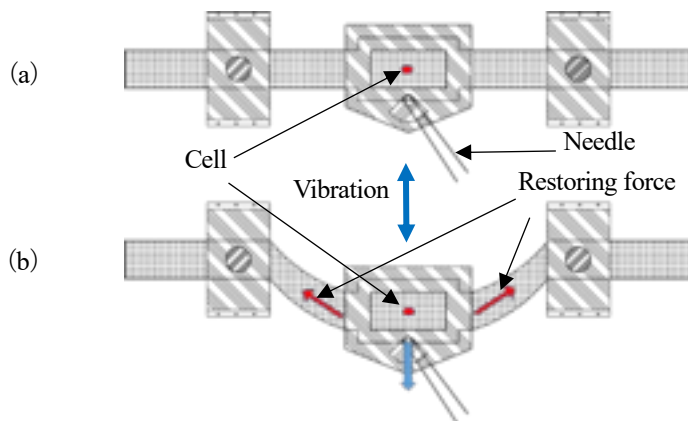


図 2 振動微小ステージの駆動方法

フォトリソグラフィなどを用いた微細加工技術を用いて振動微小ステージを製作するプロセスを開発し、細胞振動刺激マイクロアレイデバイスを完成させた。

(2) 試作した細胞振動刺激マイクロアレイデバイスの駆動特性評価

試作した細胞振動刺激マイクロアレイデバイスの振動中の挙動や顕微鏡観察像の良否の評価を行った。振動微小ステージの駆動は以下のように行った。ファンクションジェネレータで正弦波信号を生成し、生成した正弦波信号をピエゾドライバで増幅させ、ピエゾアクチュエータに印加した。ピエゾアクチュエータに接続した針で振動微小ステージを振動させた。ディッシュ内には純水を入れ、振動微小ステージを振動させたときの様子を倒立型位相差顕微鏡 (CK40、OLYMPUS) と高速カメラ (MEMRECAM Q1m、(株) ナックイメージテクノロジー) を用いて最大 2800 frames/s で観察した。表 1 に振動微小ステージに与えた振動条件を示す。振動条件は周波数 15、45、90Hz であり、各周波数で加速度振幅 0.1 G または 0.2 G の振動が得られるように振幅を設定した。

表 1 振動条件

Acceleration Amplitude [G]	Frequency [Hz]	Total amplitude[μm]
0.1	15	220
	45	24
	90	6
0.2	45	49
	90	12

図 3 は振動微小ステージの駆動中の観察写真である。駆動条件は、周波数 15Hz、全振幅 220 μm である。観察結果より、駆動時にシリコン梁のガラス基板への貼り付きや振動微小ステージの回転は見られず、振動微小ステージが針の動きに追従して直線運動を行っていたことから、正

常に振動していることがわかった。また、振動による観察像の劣化は観察されなかった。他の振動数、振幅でも同様であった。したがって、本研究で製作した細胞振動刺激マイクロアレイデバイスは、振動微小ステージへ播種した細胞に対しても振動刺激を与える機能を有していると考えられ、振動下の細胞観察に有用と考えられる。

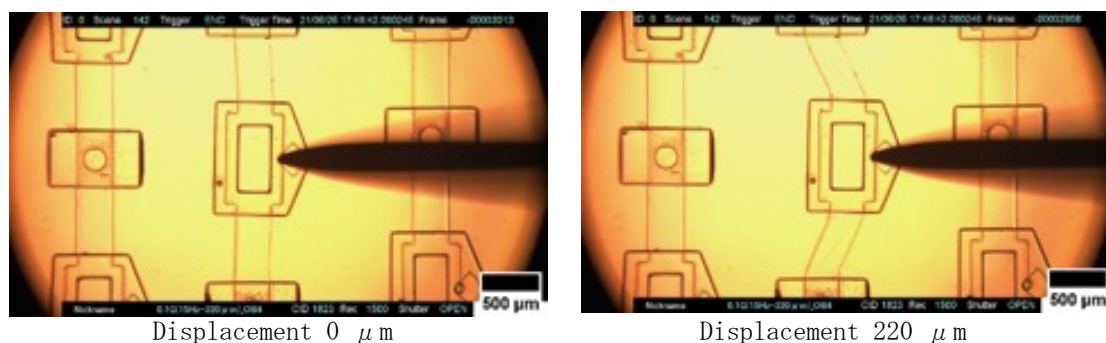


図3 振動時の振動微小ステージの顕微鏡写真(周波数15 Hz, 全振幅220 μm , 1500 frames/s)

しかし、振動刺激を受ける培養細胞の細胞小器官の動態の観察手法の開発過程において、細胞小器官を観察する上で必要な高倍率の高速撮影では、細かな動態観察に必要な明るさを持つ動画を得られないことが明らかとなった。これは観察光学系の照明の明るさや高速カメラの感度の問題である。今後は観察に用いる機器・手法の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 湯谷祥樹、中原佐、佐藤克也、南 和幸
2. 発表標題 細胞振動マイクロレイデバイスの開発
3. 学会等名 日本機械学会 2021年度年次大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	佐藤 克也 (Sato Katsuya) (10403651)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(理工学域)・准教授 (16101)	
研究分担者	中原 佐 (Nakahara Tasuku) (00756968)	山口大学・大学院創成科学研究科・准教授 (15501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------