

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04545

研究課題名（和文）体内における細胞組織精密操作技術の開発

研究課題名（英文）Development of technologies for precise manipulation of cell and tissue in the body

研究代表者

芳賀 洋一（Haga, Yoichi）

東北大学・医工学研究科・教授

研究者番号：00282096

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,400,000円

研究成果の概要（和文）：1日の中で複数回生細胞を採取し解析することで特定のタンパク質産生に関わる遺伝子発現周期性を明らかにでき、これにより日内変動の乱れ、未病の機序、適切な投薬など根拠を持って分析できるようになる。充実性臓器からの採取について生検鉗子類似の機構を一括作製し低侵襲かつ間欠的に細胞採取を行う見通しが得られた。皮膚組織採取用デバイスを用いて摘出ブタ皮膚組織から50個の細胞を採取でき、さらにマウスを用いた動物実験によりマウス皮膚から生細胞を採取できることを確認した。超音波による微細振動を利用した粘膜組織からの細胞採取について摘出ブタ食道粘膜の同じ部位から1000個以上の細胞を繰り返し採取できることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1日の中で複数回生細胞を採取し解析することで、特定のタンパク質産生に関わる遺伝子発現の周期性を明らかにできることが動物実験により明らかにされているが、現状の細胞採取の手段は侵襲性が高く、より低侵襲にすることが望ましく、これによりヒトに対しても適用できようになると期待される。生活リズムの乱れが特定の疾患の発症や増悪に繋がることが知られており、時計遺伝子の発現リズムを分析することで具体的な分析が可能になる。また、特定の臓器における特定のタンパク質産生の周期性に合わせた、より効果的で副作用の少ない投薬が実現できると期待される。さらに発病には至らないが健康な状態ではない未病の分析に役立つと期待される。

研究成果の概要（英文）：Collecting and analyzing viable cells multiple times during a day can investigate the periodicity of gene expression involved in specific protein production, enabling various analyses such as circadian rhythm disturbance, mechanisms of unwellness, and appropriate medication. The prospect of minimally invasive intermittent cell collection was confirmed by batch fabrication of biopsy forceps-like mechanisms for cell collection from solid organs. The collection of 50 cells from extracted porcine skin tissue using a device for skin tissue was confirmed, and furthermore, we confirmed that we could collect living cells from mouse skin through animal experiments using mice. Moreover, we demonstrated that more than 1,000 cells could be repeatedly collected from the same area of the esophageal mucosa of the extracted porcine esophagus using a device with ultrasonic micro-vibration to collect cells from the mucous membrane tissue.

研究分野：微細加工技術を用いた医療機器開発

キーワード：細胞 切離 粘膜 タンパク質 低侵襲 鉗子 皮膚

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 人体は多くの細胞で構成されているが、それぞれの臓器における細胞は特定のタイミングで特定の量の RNA を産生しタンパク質を発現し動的に変化し活動しており、信号として働く RNA やタンパク質を用いて臓器間においてコミュニケーションを取り、協調して活動している。このため、ある病態において特徴的な RNA およびタンパク質の発現パターンが生じていることが知られている、また、細胞におけるタンパク質発現は臓器ごとに 1 日の中で特定の周期性をもって起こることが知られており、このリズムの変調が、様々な病気の要因として強く関わっていることが分かってきている。このような、体内における様々な細胞どうしのコミュニケーション状態および動的な振る舞いを把握することで、より深い生理状態の新たな理解と、病態解明に役立つ、今までにない有効な手段になると期待される。

(2) 一般に内視鏡やカテーテルなどの低侵襲医療機器は一時的に体内に挿入され、検査、治療が終わると抜去されるが、その手技の大半は病変組織の圧排、採取、切除および縫合などであり、また、ステントや塞栓物質としての金属コイルなどが留置されるが、いずれも組織レベルの介入手技となっている。様々な臓器における細胞の動的活動を数時間ごとに完全に把握することは難しいが、細胞採取デバイスの形状と手技を工夫することで、一定期間、数時間ごとの細胞採取ができる場合がありうる。例えば体内から液体を持続的に排出するドレナジカテーテルの留置、逆に体内局所にカテーテルを留置し持続的に薬液や栄養を投与することが広く行われており、このようなシステムと手技を参考に一定期間留置し局所の細胞を数時間ごとに採取し分析するシステムとすることができると考えられる。

(3) このような、身体にダメージを与えず体内局所において数 10 から数 100 個レベルの細胞を精密操作するには、人間の手技を用いた従来の手段では難しく、微細加工技術を用いて開発作製できる機器の新規開発が必要となる。

2. 研究の目的

(1) 本研究において、生きて生活している生体における様々な臓器、組織における細胞レベルの相互作用の解明につながる、極低侵襲に採取する基礎技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) 充実性臓器からの細胞採取：体内局所から間欠的に生細胞を採取する手段として生検鉗子があるが、1 日に複数回の採取を行う際には生検鉗子のコストが高く適用できない。一括作製可能な低侵襲で安価な生検鉗子類似の機構を設計、作製し、工学的評価を行い、その後、摘出ブタ皮膚組織を用いた採取実験を行った。切断方法として押切作用を利用した押切型デバイスと剪断作用を利用した剪断型デバイスの 2 種類のデバイスを作製し、それぞれブタ摘出臓器を用いて評価を行った。

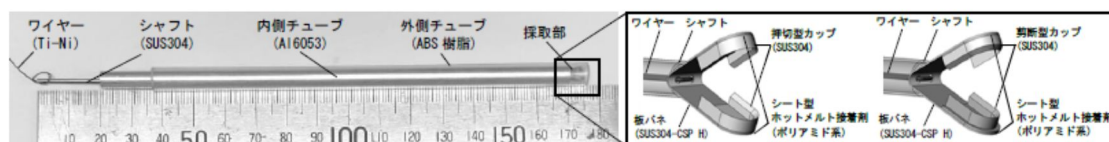


図 1 充実性臓器からの細胞最終デバイスの外観(左)と 2 種類の採取部デザイン(右)

(2) 皮膚からの細胞採取：皮膚からの細胞採取用デバイスの構成を図 2 に示す。ランジュバン型振動子から発生した超音波は超音波ホーンによって増幅され、30G(外径 0.3 mm、内径 0.13 mm)の微細針に伝搬される。針から皮膚組織に超音波を照射し細胞間の結合を切断または弱める。リン酸緩衝生理食塩水(PBS)を注入し、吸引することで 2 本の針の間において細胞を採取する。

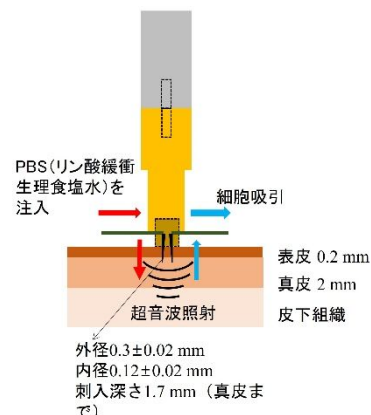


図 2 皮膚採取用デバイスの構成

(3) 粘膜組織からの細胞採取：粘膜組織からの細胞採取デバイスの構成を図3に示す。ランジュバン型振動子から発生した超音波は金属棒によって、デバイス先端部と粘膜表面の間に作られたキャビティ内に満たした生理食塩水を介して粘膜組織に伝搬され、細胞間の結合を切断または弱める。キャビティ内へリン酸緩衝生理食塩水(PBS)を注入、吸引することで細胞を採取する。

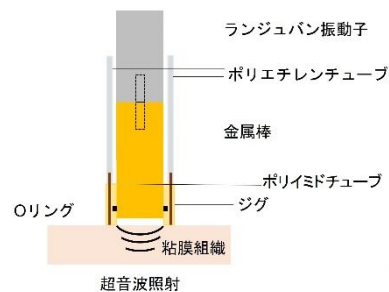


図3 粘膜組織からの細胞採取デバイスの構成

4. 研究成果

(1) 充実性臓器からの細胞採取：

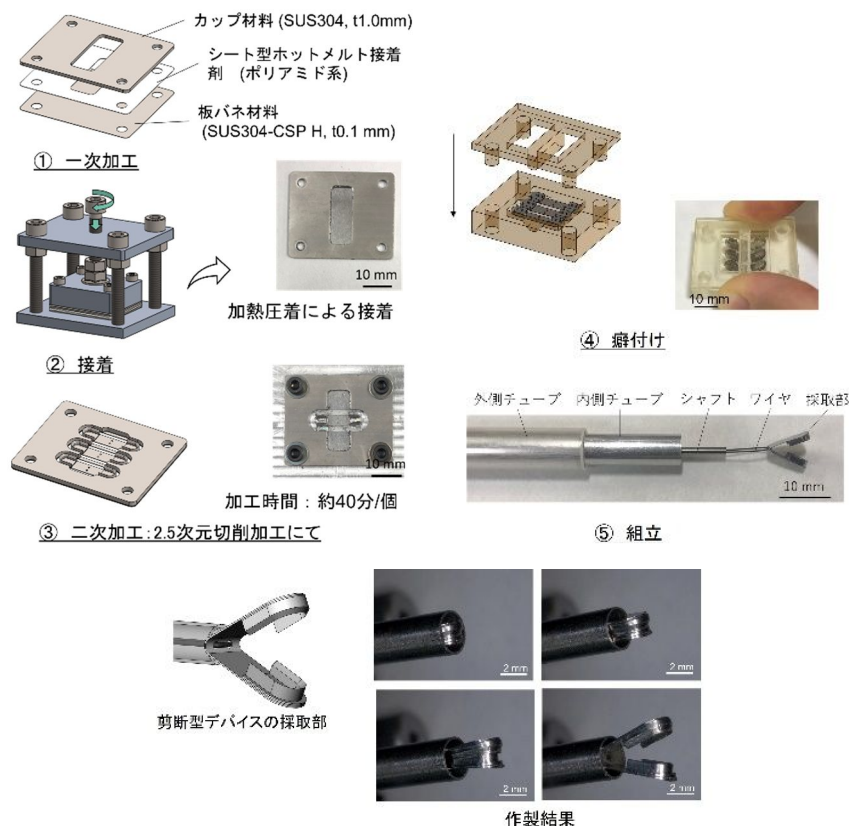


図4 一括作製工程(上)と剪断型デバイス先端部の作製結果(下)

提案した生検鉗子類似機構の一括作製工程を図4上に、作製した剪断型デバイス先端部を図4下に示す。押切型デバイスでは、プタ摘出臓器を用いて食道粘膜組織と肝臓組織を採取できたものの、複数個の一括作製には採取部の噛み合わせや切断面の鋭さの問題から課題が残った。剪断型デバイスにおいては寸法誤差を許容し効率よく切断方向に力を変換できるデバイスが試作でき、間欠的細胞採取に向けた低コストかつ低侵襲的なデバイス開発に見通しが得られた。

(2) 皮膚からの細胞採取：試作した皮膚からの細胞採取用デバイスを図5に示す。これを用いて摘出プタ皮膚組織から細胞採取を試みた。採取した細胞を含んだ生理食塩水を遠心分離し、染色キット(Live/Dead Cell Staining Kit II)で染色し蛍光顕微鏡を用い波長488nmの励起蛍光で染色細胞を観察した(図6)。結果として約50個の細胞採取が確認できた。

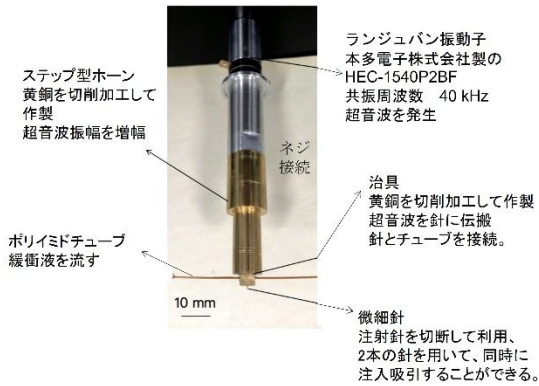


図5 試作した皮膚からの細胞採取用デバイス

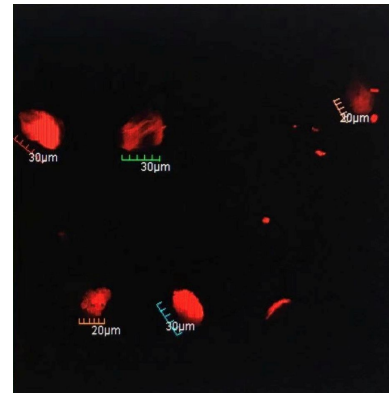


図6 蛍光顕微鏡を用いた観察

さらにマウスを用いた動物実験によりマウス皮膚から1回の施行で約80個の生細胞を採取できることを確認した。この際、緩衝液には細胞間結合の分離促進のためコラゲナーゼ溶液を加えた。

(3) 粘膜組織からの細胞採取：試作した粘膜からの細胞採取用デバイスを図7に示す。これを用いて摘出ブタ食道粘膜から細胞採取を試みた。図8に蛍光顕微鏡を用いた観察の様子を示す。結果として同じ部位から1000個以上の細胞を繰り返し採取できることを確認した。



図7 試作した粘膜からの細胞採取用デバイス

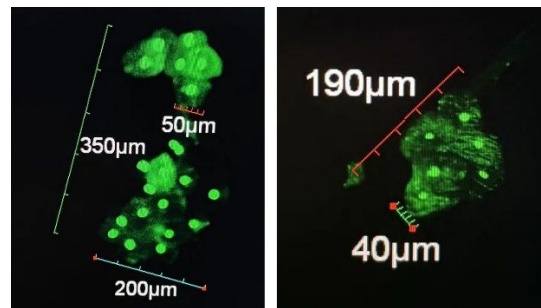


図8 蛍光顕微鏡を用いた観察

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ye Yang, Uechi Tatsuya, Tsuruoka Noriko, Akashi Makoto, Haga Yoichi	4. 巻 34
2. 論文標題 Device to Collect Skin Cells Using Ultrasound Irradiation and Aspiration	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sensors and Materials	6. 最初と最後の頁 3383 ~ 3383
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18494/SAM3983	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yang Ye, Uechi Tatsuya, Tsuruoka Noriko, Akashi Makoto, Haga Yoichi	4. 巻 24
2. 論文標題 Cell Collection Device from Mucosal Tissue Using Cavitation Caused by Ultrasound Irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Japan Society of Computer Aided Surgery	6. 最初と最後の頁 217 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5759/jscas.24.217	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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 小島蒼生, 鶴岡典子, 芳賀洋一
2. 発表標題 体内局所からの間欠的細胞採取デバイス
3. 学会等名 第56回日本生体医工学学会東北支部大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 粘膜細胞採取装置及び粘膜細胞採取方法	発明者 芳賀洋一、鶴岡典子、ヨウヨウ	権利者 国立大学法人東北大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2023-008119	出願年 2023年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	明石 真 (AKASHI Makoto) (30398119)	山口大学・時間学研究所・教授 (15501)	
研究分担者	鶴岡 典子 (NORIKO Tsuruoka) (70757632)	東北大学・工学研究科・助教 (11301)	

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