

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04547

研究課題名（和文）微小気泡と音響放射力による細胞動態制御を応用した3次元多層管腔構造体の形成

研究課題名（英文）Fabrication of three-dimensional tube structure with multilayer by applying active cell control using microbubbles and acoustic radiation force

研究代表者

榎田 晃司（Masuda, Kohji）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：60283420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：任意の形状の人工血管を作製するために、脂質でできた微小気泡で囲まれた血管内皮細胞を流路内壁に音響放射力で保持し、そのままの状態を細胞を培養する可能性を検証した。まず、超音波曝露中の脂質バブルの破壊を調査して、細胞の損傷を決定した。次に、超音波を照射せずに微小気泡の存在下で細胞を培養したところ、細胞培養における脂質濃度の限界が明らかになった。その後、時空間分割放射法や時間反転法を用いて、音響強度の類似した単焦点音場、多焦点音場、棒状音場を設計した。最後に、細胞捕捉から培養までの一連の過程を検証し、壁面上の細胞の培養面積を比較したところ、棒状音場で有意な細胞生着が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により複雑な形状や壁厚の変化、形態異常に対応可能な人工血管の生産技術に発展すれば、様々な治療法を検証する手段として、動物実験の代替となる可能性が高く、医薬品や治療機器等の検証、新たな治療方法の開発手段として利用することができる。現状では動物実験や生体実験に様々な制限がかけられる傾向にあるため、本研究により、病態血管そのもの、あるいはそれらの周囲に培養した臓器実質も含めた実験臓器系を用いることができるため、血管内治療の開発研究に寄与し、コスト面・倫理面で大きな変革をもたらすことが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to fabricate artificial blood vessels with arbitrary shapes, vascular endothelial cells surrounded by lipid bubbles were retained on the inner wall of a flow path using acoustic radiation force to verify the possibility of in situ cell culturing. First, the destruction of lipid bubbles during exposure to ultrasound was investigated to determine the cell damage. Next, by culturing the cells in the presence of lipid bubbles without exposure to ultrasound, the results revealed a limitation in lipid concentrations for cell culturing. Thereafter, we designed single focal, multifocal, and bar-shaped acoustic fields with similar acoustic intensities by using tempo-spatial division emission or time-reversal method. Finally, cell retention was performed to compare the cultured areas of the cells on the wall. Significant cell engraftment was confirmed with the bar-shaped acoustic fields.

研究分野：医用超音波工学

キーワード：音響放射力 人工血管 微小気泡 音場 血管内皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

バイオプリンタに代表される細胞の3次元構造構築に関する分野の発展は目覚ましく、肝組織や人工膵島、靭帯等の組織再生を目的とした細胞凝集体(スフェロイド)形成、薬剤の効果検証のための組織や器官(オルガノイド)の形成などが数多く報告されている。細胞は、同種・異種の細胞を介して集積することで、単体の細胞では得られない多様な機能を発現することが知られており、細胞の3次元配置の制御が、構造体の機能を左右する重要なファクターであると考えられている。細胞の3次元構造体の生産方法としては、非接着性培養基板を利用した浮遊培養法、細胞懸濁液の液滴中で重力を利用したハンギングドロップ法、回転する細胞培養チャンバーを用いたロータリー法などが既に実用化されており、これらの方法の発展により、実際の生体の組織構造を再現した人工臓器の構成が期待されている。一方で上記の手法では、以下の通りの技術的限界があるため、所望の臓器の形状を構成できないという問題点があり、学術的なブレークスルーが求められている。

・血管や腸管に応用可能な管腔構造体の形成が困難：3次元的に張り巡らせた針上に細胞を配置する手法はあるが、強度調整の観点から壁厚1mm以下の管腔構造作成は困難である。また現状では、直線状の管腔構造体しか製作できない。

・細胞間接着を物理的に促進する手段がない：細胞自体にストレスを与えたり、接着因子などにより分子的な接着促進技術は数多く研究されているが、構造体の成長は細胞間の受動的な融合に頼っているため、所望の構造体の構成には日単位の時間がかかる。

2. 研究の目的

本研究では、応募者がこれまで研究してきた音響放射力による微小物体の動態制御技術を応用し、血管内皮細胞や腸管上皮細胞と微小気泡を用いて、多層構造を有する3次元管腔構造体を構成するための基盤技術を創生することを目的として、本研究を提案する。

応募者らの先行研究により、細胞の周囲に微小気泡(直径0.5~数ミクロンの脂質膜)が数多く取り付いた細胞-微小気泡凝集体(以下、凝集体)は、細胞のみの場合に比べて音響放射力による制御性が向上する。微小気泡には、予め目的の細胞に特異的に接着するリガンドが修飾されており、攪拌による物理的な接近により、凝集体が構成される。微小気泡の音響特性(音響インピーダンス)は細胞や周囲媒質(生理食塩水や血液)と大きく異なるため、細胞のみの場合は音波のエネルギーの多くが透過するのに対し、凝集体では微小気泡によって音波の反射係数が増大し、音響放射力の伝達効率が向上し、音波の進行方向に推進力が発生する。この原理を応用し、予め用意した所望の形状の流路内壁に、異なる種類の細胞が積層した構造体を形成する。

3. 研究の方法

パーフルオロプロパン(PFP, C3F8)ガスを含む脂質バブルを調製し、細胞に共有結合するcRGDペプチドを結合させて修飾した。コラーゲン膜の基底膜を有するPDMSで作られた流路内の細胞の分布を評価するために、細胞を事前にCalcein-AM溶液を用いて染色した。中心周波数3MHz、素子数128個の2次元アレイトランスデューサを用いて、時間反転法を用いて任意の形状の音場を生成した。超音波曝露下での細胞の挙動は、蛍光顕微鏡(オリンパス、DP74付きBXFM)を使用して観察された。細胞の保持後、24時間培養した。

4. 研究成果

図1の上段は、ハイドロフォン(Onda HNR-1000)を用いて測定した多焦点(MF)と棒状(BS)の音場の正規化分布である。MFとBSの最大音圧をそれぞれ400kPa-ppと250kPa-ppに調整することで、SATA(空間平均時間平均)の音響強度はほぼ同じ(143mW/cm²)になった。細胞濃度1.0 x 10⁵/mL、LBs濃度0.3 mg/mLのBSC懸濁液を流速10mm/s、照射時間60秒で流路内を通過させた。

図1の中段と下段は、それぞれ細胞の保持分布と培養分布の蛍光画像を示す。捕捉された細胞の分布に有意差は認められなかったが、MFでは培養細胞はほとんど見られず、細胞がほぼ絶滅したか、剥離したかのどちらかであったことが示唆された。一方、BSでは培養細胞が広く広がっていた。その結果、音場の傾きが細胞の保持から培養までの連続的な手順で支配的であることが明らかとなった。

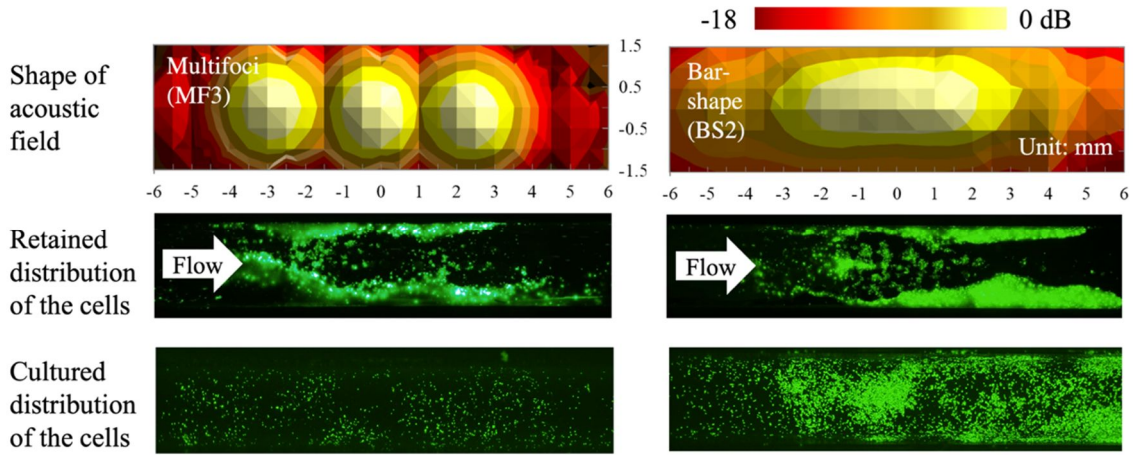


図1 設計した音場分布（上段）、捕捉された細胞分布（中段）、培養24時間後の細胞分布（下段）

図2は実験装置を示す。気泡を細胞に接着させるために、0.5 mg/mLの濃度の修飾気泡の懸濁液で流路内を満ち、基底の生着細胞への気泡の接着を進行させた。次に、浮遊気泡の懸濁液を0.5mg/mLの濃度で注入し、超音波バースト波を照射し、生細胞を染色することにより、カルセインAM溶液を用いて細胞生存率を評価した。超音波照射の条件は、周波数3MHz、最大照射時間60秒とした。

図3は、接着気泡の有無と最大音圧の印加による細胞生存率の比較である。最大音圧が300kPa-ppを超えると、細胞生存率の有意な向上が確認された。これらの結果は、細胞上の接着気泡が、超音波照射と浮遊気泡の存在によって引き起こされる細胞損傷から細胞を保護する可能性がある」と推測される。細胞に付着した気泡が振動し、接着気泡と細胞周囲に浮遊する気泡との間に反発力を生じさせ、さらに浮遊気泡を分散させ、気泡の破壊効果を最小限にとどめるといふ、細胞保護のメカニズムの可能性が有る。今後、さらなる実験を通じて、より詳細な調査を行う予定である。

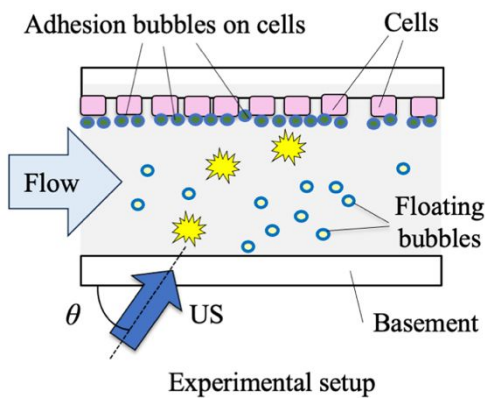


図2 超音波照射対象となる流路を含む実験状況

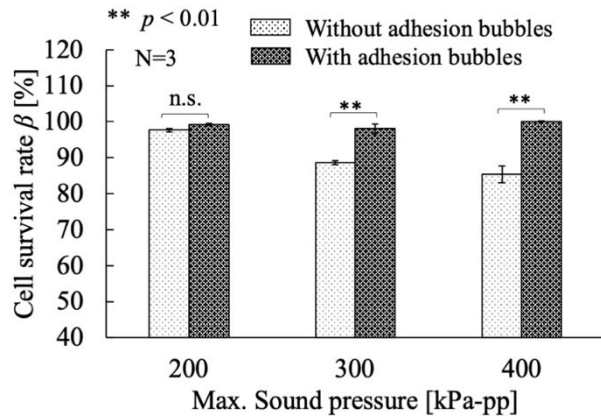


図3 照射超音波の音圧に対する細胞生存率の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ayako Noguchi, Shunya Watanabe, Kota Konishi, Narumi Ogawa, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Ryo Suzuki, and Kohji Masuda:	4. 巻 63
2. 論文標題 Experimental conditions for efficient retention of vascular endothelial cells on channel wall using lipid bubbles and acoustic interference	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 04SP30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ad2f17	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 Narumi Ogawa, Yoshiki Ito, Shunya Watanabe, Shinnosuke Araki, Naoya Yoshida, Kota Konishi, Ayako Noguchi, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Ryo Suzuki, and Kohji Masuda	4. 巻 63
2. 論文標題 Investigation of damage in vascular endothelial cells caused by lipid bubbles under ultrasound irradiation to verify the protective effect on cells	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 04SP25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ad2c66	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 Naoya Kajita, Yoshiki Ito, Shunya Watanabe, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki & Kohji Masuda	4. 巻 50
2. 論文標題 Viability variation of T-cells under ultrasound exposure according to adhesion condition with bubbles	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Medical Ultrasonics	6. 最初と最後の頁 121-129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10396-022-01277-5	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 Omata Daiki, Munakata Lisa, Kageyama Saori, Suzuki Yuno, Maruyama Tamotsu, Shima Tadimitsu, Chikaarashi Takumi, Kajita Naoya, Masuda Kohji, Tsuchiya Naoto, Maruyama Kazuo, Suzuki Ryo	4. 巻 30
2. 論文標題 Ultrasound image-guided gene delivery using three-dimensional diagnostic ultrasound and lipid-based microbubbles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Drug Targeting	6. 最初と最後の頁 200 ~ 207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/1061186X.2021.1953510	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 -

1. 著者名 Yoshiki Ito, Tatsuya Saito, Shunya Watanabe, Naoya Kajita, Yoshitaka Miyamoto, Ryo Suzuki, Kazuo Maruyama, Daiki Omata, and Kohji Masuda	4. 巻 61
2. 論文標題 Validation of damage on vascular endothelial cells under ultrasound exposure according to adhered situation of bubbles	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jpn J. Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SG1066
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac4d61	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 Takumi Chikaarashi, Shunya Watanabe, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Kazuo Maruyama, Ryo Suzuki, and Kohji Masuda	4. 巻 61
2. 論文標題 Experimental study of ultrasound retention of bubble-surrounded cells under conditions of acoustic field and flow velocity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Jpn J. Applied Physics	6. 最初と最後の頁 SG1071
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.35848/1347-4065/ac54f9	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 -

[学会発表] 計18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Narumi Ogawa, Yoshiki Ito, Shunya Watanabe, Kota Konishi, Ayako Noguchi, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Ryo Suzuki, Kohji Masuda
2. 発表標題 Comparison of damage in vascular endothelial cells on basement membrane according to surrounding microbubbles and irradiation direction of ultrasound
3. 学会等名 The 44th Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Shunya Watanabe, Kota Konishi, Ayako Noguchi, Narumi Ogawa, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Ryo Suzuki, and Kohji Masuda
2. 発表標題 Experimental conditions for efficient retention of vascular endothelial cells on channel wall using microbubbles and acoustic interference
3. 学会等名 The 44th Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ayako Noguchi, Shunya Watanabe, Kota Konishi, Narumi Ogawa, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Ryo Suzuki, and Kohji Masuda
2. 発表標題 Experimental conditions for in situ culture of vascular endothelial cells retained to wall surface with microbubbles using acoustic radiation force
3. 学会等名 The 44th Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小川なる美、伊藤芳樹、宮本義孝、鈴木亮、小俣 大樹、榎田 晃司
2. 発表標題 超音波照射下における周囲気泡条件および壁存在条件に対する血管内皮細胞の損傷の比較
3. 学会等名 日本超音波医学会第96回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡部舜也、小西康太、野口彩子、宮本義孝、小俣大樹、鈴木亮、榎田晃司
2. 発表標題 微小気泡と音響放射力を利用した血管内皮細胞の流路内捕捉後のin situ培養のための実験条件の検討
3. 学会等名 日本超音波医学会第96回学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤 芳樹、齊藤 達也、渡部 瞬也、吉田 直也、宮本 義孝、鈴木 亮、小俣 大樹、丸山 一雄、榎田 晃司
2. 発表標題 血管内皮細胞に付着した微小気泡の密度に対する超音波照射下での細胞損傷の検証
3. 学会等名 日本超音波医学会第95回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡部舜也、近嵐匠、伊藤芳樹、荒木信乃介、宮本義孝、小俣大樹、鈴木亮、丸山一雄、榎田晃司
2. 発表標題 超音波照射による微小気泡 細胞凝集体の壁面捕捉能における接着細胞と浮遊細胞の比較
3. 学会等名 日本超音波医学会第95回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒木信乃介, 吉田直也, 小俣大樹, 鈴木亮, 榎田晃司
2. 発表標題 超音波照射後の粒径分布変化に基づく微小気泡の特性の解析
3. 学会等名 日本超音波医学会第34回関東甲信越地方会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoshiki Ito, Shunya Watanabe, Narumi Ogawa, Ayako Noguchi, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Ryo Suzuki, Kohji Masuda
2. 発表標題 Comparison of damage in vascular endothelial cells surrounded by microbubbles under ultrasound irradiation according to presence condition of the cells
3. 学会等名 The 43rd Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Shunya Watanabe, Kota Konishi, Yoshiki Ito, Yoshitaka Miyamoto, Daiki Omata, Ryo Suzuki, Kohji Masuda
2. 発表標題 Study of culture conditions of vascular endothelial cells retained to vascular wall surface with microbubbles by acoustic radiation force
3. 学会等名 The 43rd Symposium on UltraSonic Electronics (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梶田 直哉 , 齊藤 達也 , 伊藤 芳樹 , 近嵐 匠 , 小俣 大樹 , 鈴木 亮 , 梶田 晃司
2. 発表標題 超音波照射条件に対するT細胞の傷害計測とパラメータ依存性の解析
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 信乃介, 阿久津 亮太, 大塚 拓也, 齊藤 達也, 近嵐 匠, 梶田 晃司
2. 発表標題 流体中の微小気泡-細胞凝集体の音響放射力に基づく挙動解析
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤芳樹, 齊藤達也, 梶田直哉 , 宮本義孝, 小俣大樹, 丸山一雄, 鈴木 亮 , 梶田晃司
2. 発表標題 微小気泡濃度と細胞への付着状況を考慮した超音波照射下での血管内皮細胞への影響
3. 学会等名 日本超音波医学会第 94 回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近嵐 匠, 梶田直哉, 齊藤達也, 阿久津亮太, 荒木信乃介, 小俣大樹, 丸山一雄, 鈴木 亮, 梶田晃司
2. 発表標題 超音波音場形状に対する生体血管壁面での細胞- 微小気泡凝集体の捕捉とその解析
3. 学会等名 日本超音波医学会第 94 回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶田 直哉 , 齊藤 達也 , 伊藤 芳樹 , 近嵐 匠 , 小俣 大樹 , 鈴木 亮 , 梶田 晃司
2. 発表標題 超音波照射条件に対するT細胞の傷害計測とパラメータ依存性の解析
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 信乃介, 阿久津 亮太, 大塚 拓也, 齊藤 達也, 近嵐 匠, 梶田 晃司
2. 発表標題 流体中の微小気泡-細胞凝集体の音響放射力に基づく挙動解析
3. 学会等名 第60回日本生体医工学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤芳樹, 齊藤達也, 梶田直哉 , 宮本義孝, 小俣大樹, 丸山一雄, 鈴木 亮 , 梶田晃司
2. 発表標題 微小気泡濃度と細胞への付着状況を考慮した超音波照射下での血管内皮細胞への影響
3. 学会等名 日本超音波医学会第 94 回学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 近嵐 匠, 梶田直哉, 齊藤達也, 阿久津亮太, 荒木信乃介, 小俣大樹, 丸山一雄, 鈴木 亮, 梶田晃司
2. 発表標題 超音波音場形状に対する生体血管壁面での細胞- 微小気泡凝集体の捕捉とその解析
3. 学会等名 日本超音波医学会第 94 回学術集会
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	宮本 義孝 (Miyamoto Yoshitaka) (20425705)	国立研究開発法人国立成育医療研究センター・周産期病態研究部・研究員 (82612)	
研究 分担者	鈴木 亮 (Suzuki Ryo) (90384784)	帝京大学・薬学部・教授 (32643)	

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
---------	---------