

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22650100

研究課題名（和文） 磁性ビーズを用いた細胞壁ナノ振動刺激とダイナミック計測系の確立

研究課題名（英文） Cell stimulation using direct vibration with magnetic beads and development of a measurement system

研究代表者

増澤 徹 (MASUZAWA Toru)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：40199691

研究成果の概要（和文）：

本研究では、大きさ数 100nm から数 10 μ m の磁性ビーズを細胞に接着させ、交番磁界を与えることにより、細胞膜の直接振動刺激を行い、細胞機能の発現への影響を研究できるシステムを開発した。①磁性ビーズの上下動を検出する共焦点光学系と左右の振動を検出する反射光角度検出系の両方に対応できる計測システム、②パーソナルコンピュータと専用 DSP ボード、オペレーショナルンプ回路、電磁石コイルから成る交番磁界発生システムを構築した。励磁周波数 80Hz で最大振動振幅 451nm で磁性ビーズを加振することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Cell stimulation system using direct vibration with magnetic beads, which has a diameter of several micro meters, attached on the cell wall has been developed to investigate the expression of cell function with the vibration stimuli. The attached magnetic beads are vibrated with an alternating magnetic field and the vibration amplitude is measured by newly developed optical system. The magnetic beads were vibrated with maximum oscillation amplitude of 451 nm with a excitation frequency of 80 Hz.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	0	2,200,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	240,000	3,240,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：再生医用工学，細胞刺激，磁性微粒子，振動検出，交番磁界，レーザトラップ

1. 研究開始当初の背景

再生医療をより一般的な治療方法として確立するには細胞培養にかかる時間の短縮，分化や遺伝子導入，機能発現等の種々の細胞機能制御の方法開発が必須である。生化学的かつ倫理的問題に関係がない細胞機能調節方法として申請者は物理的な超微小振動に注

目している。今までの研究で、振動振幅が数十～数百ナノメートル、振動周波数が数百～数千 kHz の超微小振動（ナノ振動）を培養細胞に負荷した場合、培養細胞の増殖能、接着能、薬剤導入効率、遺伝子導入効率に影響を与えることを実証しており、茨城大学、東京医科歯科大学共同で特許申請を行っている。

今まで開発したナノ振動負荷装置は培養シャーレ全体に揺らし、接着細胞に振動負荷を与える構造であるため、細胞に対して加えられる物理的刺激としては振動そのものの他に培養液と細胞壁面に生じる剪断応力も考えられ、どちらの機械的刺激が優位であるのか検討する必要が出てきた。そこで、細胞に確実に振動を負荷し、その影響を見る基礎実験系として磁性ビーズ（磁気ビーズ）を応用した細胞振動刺激方式を考えた。類似の研究報告としては超音波などを用いたものがあるが、細胞に与えるエネルギー強度が本法に比較し桁違いの強度であるため、超音波の細胞破壊に関しては様々なデータがあるが、細胞機能へ与える影響に関してはよく分かっていない。磁性ビーズの医療への応用に関しては、ドラッグデリバリーシステムへの応用や、ハイパーサーミアへの応用、細胞関係分野における応用としては磁気マーカー応用、細胞分離技術、細胞壁弾性性状計測への応用等が上げられるが、本研究のように磁性ビーズを細胞刺激のツールとして用いる研究は新規である。

2. 研究の目的

本研究では、大きさ数 100nm から数 μm の磁性ビーズを細胞に接着させ、交番磁界を与えることにより、細胞膜の直接振動刺激を行い、細胞機能の発現への影響を検討するシステムの開発を目的とする。①共焦点光学系 + 交番磁界発生装置によるナノ振動観察システムの構築、②ナノ振動観察システムによるナノビーズ振動周波数特性の計測系の構築を行い、ナノビーズ振動下での細胞機能観察ができるシステムの実現を行う。

3. 研究の方法

(1) 交番磁界発生装置

図 1 に振動印加のための交番磁界発生装置のコアを示す。本 C コアに 400 巻きのコイルを巻き、電磁石を形成する。本電磁石で発生した交番磁界により細胞に結合した磁性ビーズ（粒径 8 μm ）を振動させ、細胞を直接刺激する構造とした。磁性ビーズは Arg-Gly-Asp (RGD) ペプチドコーティングすることで抗原抗体処理し細胞膜上のインテグリンと結合させる。電磁石に印加する交流電流の振幅と周波数を変化させることにより、磁性ビーズの振動周波数および振動振幅を変化させることができる。

(2) 振動検出装置

図 2 に製作した振動検出装置を示し、図 3 に振動検出原理の概略図を示す。振動検出装置は CCD カメラ、ビームスプリッター、グリーンレーザー、対物レンズ、ステージから構成される。レーザー光を対物レンズを通して磁性ビーズに照射する。磁性ビーズに照射されたレーザー光は磁性ビーズの振動運動に伴う位

置変化に対応し反射光の反射角度が変化する。磁性ビーズ表面における反射角度の変化に対して受光面でのレーザーの反射光の受光位置が変化する。この反射光を CCD カメラやフォトダイオードにより計測し、磁性ビーズの振動周波数及び、振動振幅を測定する。また、磁性ビーズの上下動を検出する際は共焦点光学系を用いる構造とした。

(3) 交番磁界発生装置の設計・製作と磁束密度測定

交番磁界発生装置に用いる電磁石は有限要素法解析ソフト ANSYS を用いた地場解析シミュレーションを基に発生可能な磁気吸引力の推定を行い設計した。電磁石は培養液中の磁性ビーズを振動させるのに十分な磁気吸引力を発生させるため、磁束を集中可能な C コア型とした。磁性ビーズに働く磁気吸引力は以下の理論式により求めた。

$$F = \frac{AB^2}{2\mu_0} \quad (1)$$

ここで、A は磁性ビーズの断面積、B は磁性ビーズ近傍の磁束密度、 μ_0 は真空の透磁率である。シミュレーション結果より、電磁石の間隙長さを 5 mm、コイル巻き数を 400 巻きとした。また、磁場解析により設計した電磁石の実機を作成し、C コア間隙に発生する磁束密度を測定した。コイルへの励磁電流は 0 ~ 2.5 A とした。実機の発生磁束密度の測定結果から、培養液より受ける粘性力に対し、製作した電磁石により磁性ビーズに発生可能な磁気吸引力の推定を行った。

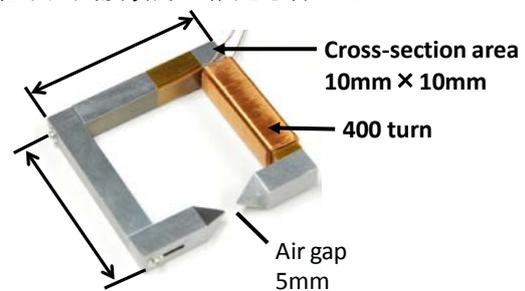


図 1 交番磁界発生コイルのコア

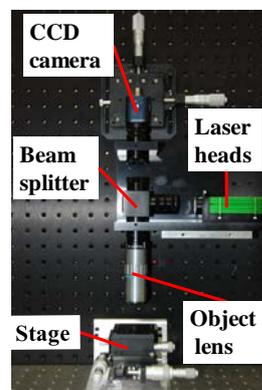


図 2 振動検出装置

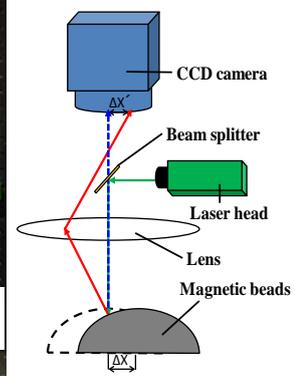


図 3 振動検出原理

(4) 磁性ビーズの振動観察

製作した交番磁界発生装置と振動検出装置を用いて交番磁界印加時の磁性ビーズの振動挙動を観察した。図4に実験系の説明図を示す。交番磁界発生装置の間隙部にスライドガラスの上に散布した磁性ビーズを配置し、その挙動を振動検出系に取り付けた高速度ビデオカメラにより撮影した。交番磁界発生装置の励磁周波数は10 Hz ~80 Hz、励磁電流は0.25 Aとした。高速度ビデオカメラは1秒あたり250枚で2秒間撮影し、その画像を画像処理ソフトウェアImage Jにより処理し、磁性ビーズの振動振幅と振動周波数を求めた。

(5) 磁性ビーズの反射光測定実験

磁性ビーズの位置変位に対する反射光の受光位置の関係の確認を行った。ステージに配置した磁性ビーズにレーザを照射し、ステージをx方向に変位させたときの反射光をセルサイズ6 μmのCCDカメラで撮影した。磁性ビーズの接着面に対し垂直にレーザが反射される位置を基準位置とし、基準位置からステージを1 μm刻みで4 μmまで変位させた。基準位置に対する反射光の移動距離はΔx'を画像解析ソフトウェアImageJを用いて計測した。CCDカメラの位置を焦点位置から50 mm刻みで200 mmまで離して反射光の移動距離を測定した。

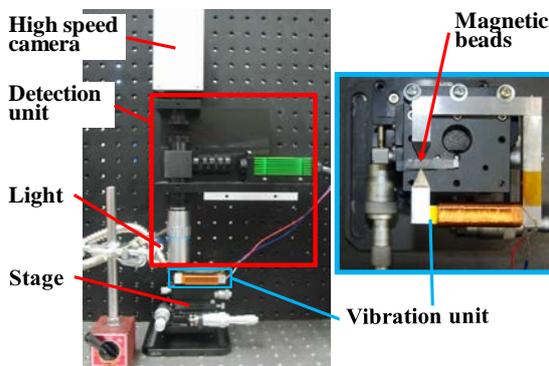


図4 磁性ビーズ振動観察実験装置

4. 研究成果

図5に電磁石の間隙中に発生する磁束密度の解析結果および実測結果を示す。製作した電磁石は励磁電流2.5 Aにおいて、解析値の85%の値である磁束密度0.13 Tを発生可能であることを確認した。磁性ビーズに働く磁気吸引力は0.35 μNと推定でき、ストークスの式より求めた細胞培養液による粘性力0.42 nNより大きく、磁性ビーズを振動させるための十分な磁気吸引力が発生可能であることを確認した。

一例として図6に磁性ビーズの高速度ビデオカメラ撮影図を示す。表1に磁気励振時の磁性ビーズの振動を観察した結果を示す。撮

影した画像から、振動振幅と振動周波数を測定した結果、磁性ビーズの振動周波数は振動印加装置の励磁周波数と同期していた。また振動振幅は振動周波数が高くなるにつれて振動振幅は小さくなった。今回用いた画像解析分解能が200 nm付近の振動振幅が得られる周波数80Hzまで振動を確認した。また、図7に周波数20 Hzのときにおける振動の波形を示す。振動周波数が励磁周波数と等しいことがわかる。

図8に磁性ビーズの位置変化に対する反射光の受光位置の変化の測定結果を示す。すべてのCCDカメラの位置において、磁性ビーズの位置変化に対して反射光の受光位置が線形に変化することを確認した。磁性ビーズの4 μmの変位を最大380 μmに増幅できることから、本振動検出系は磁性ビーズの振動を100倍で観察可能であり、最低67 nmの微小振動を計測可能であることを確認した。

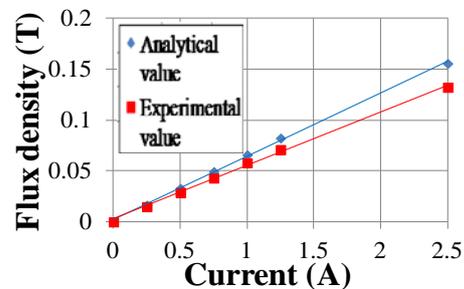


図5 磁束密度の解析値と計測値

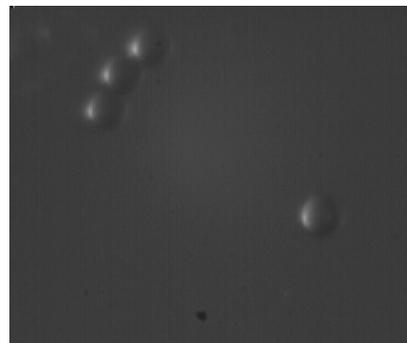


図6 磁性ビーズ観察像

表1 振動計測実験結果

励磁周波数 [Hz]	振動周波数 [Hz]	周期 [s]	最大振動振幅 [μm]
10	10	0.10	1.00
20	20	0.050	1.63
30	30	0.033	0.847
40	40	0.025	0.502
50	50	0.020	0.436
60	60	0.017	0.413
70	70	0.014	0.397
80	80	0.013	0.451

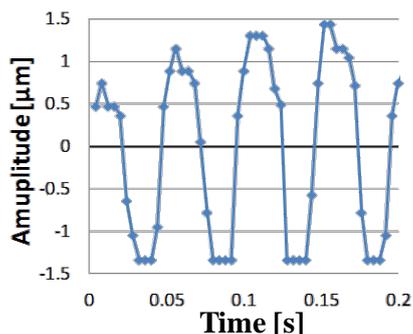


図7 振動波形 (励磁周波数 20Hz)

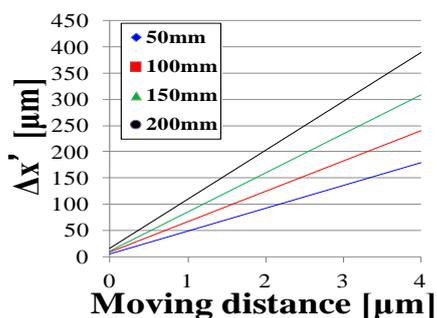


図8 反射光位置変化

まとめ：

本研究では、磁性ビーズを用いて細胞に直接ナノ振動刺激を付加し、その振動を測定するための交番磁界発生装置および振動検出装置の製作を行った。磁性ビーズに対して振動印加装置が発生可能な磁気吸引力は $0.35 \mu\text{N}$ であり、細胞培養液の粘性力 0.42 nN に対して十分な磁気吸引力であった。製作した振動印加装置と振動検出装置を用いて純水中の磁性ビーズを振動させ、最大 80 Hz までの周波数で振動していることを確認した。

振動検出装置を用いて、磁性ビーズに照射したレーザーの反射光を用いて磁性ビーズの微小振動が計測可能であることを確認した。本装置は磁性ビーズの振動を約 100 倍で観察可能であることを確認した。以上の結果より、磁性ビーズを細胞に接着させ、交番磁界を与えることにより、細胞膜の直接振動刺激を行い、細胞機能の発現への影響を検討できる基本的な加振装置、振動観察システムの構築ができた。今後、実際の細磁性ビーズを細胞に接着し、刺激を与え、細胞機能活性への影響を検討する。

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)

[学会発表] (計 1 件)

服部圭介、増澤徹、長真啓、林照剛，磁気ビーズ細胞励振系およびナノ振動計測系の開発，第 21 回ライフサポート学会フロンティア講演会，2012. 3. 3，東京

[その他]

ホームページ等

<http://www.mech.ibaraki.ac.jp/masuzawa-lab/h22kaken/list.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増澤 徹 (MASUZAWA Toru)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：40199691

(2) 研究分担者

林 照剛 (HAYASHI Terutake)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：00334011