

【目的】 現在、3D 細胞プリントに代表されるバイオプリンタの分野の発展は目覚ましく、組織や器官の形成等が数多く報告されており、実際の生体の組織構造を再現できることが期待されている。本研究では、代表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、血管内皮細胞を管腔構造に構成するための基盤技術を創生することを目的とする。微小気泡はその内部に含まれる気体によって、生体内で音響力学特性が変化することを利用して、細胞の空間的密度を低減する。本研究では、任意形状の血管形成技術を開発することを目指し、細胞が制御される条件での細胞生存率の計測と、流路内での細胞培養の可能性について検証した。

【方法】 本研究では、ウシ由来の頸動脈正常血管内皮細胞 (HH 細胞) と、共同研究者である帝京大学薬学部薬物送達学研究室より提供された微小気泡を用いた。HH 細胞は cRGD ペプチドが結合するため、表面に同ペプチドを結合させた微小気泡と、通常の微小気泡を用意し、細胞と混合した懸濁液を作製した。細胞周囲の状況と超音波照射に対する細胞生存率への影響を調べるため、微小気泡なし、通常の微小気泡、ペプチド結合微小気泡、の3パターンで生存率を計測、比較した。超音波の中心周波数は3または5 MHz とした。各懸濁液は、総細胞数 1.0×10^4 個となるように調製し、超音波の照射後、細胞の生死判定のための試薬を注入して生存率を算出した。また、細胞を人工流路内で培養して血管形状に形成するため、基盤となる流路材質に対する培養への影響を検証した。シリコン流路にコラーゲンコーティングを行った後、細胞懸濁液を注入し、培養を行った。懸濁液注入後の流路内の状況を、正立顕微鏡にて24時間経過観察した。なおこの際、流路表面にエキシマレーザーによる表面改質を行った。

【結果】 超音波の照射条件は、過去の研究で細胞の動態制御が良好に確認された最大音圧 400 kPa とした。音波が照射と休止を繰り返している比率 (Duty 比) は、30、60、100%の3種類とした。まず微小気泡が存在しない場合は、細胞に対する影響は見られないことを確認した。次に、cRGD ペプチドが付与されていない通常の微小気泡を混入させた場合は、特に周波数 3 MHz では、照射時間が長くなるほど、音圧が高いほど生存率が顕著に低下した。一方、5 MHz ではこれらの傾向は見られなかった。これに対し、cRGD ペプチドが付与された微小気泡では、3 MHz、5 MHz どちらの周波数でも、生存率の低下はみられなかった。よって細胞表面に微小気泡が付着していれば、微小気泡の破壊が細胞に与えるダメージを低減することができることが分かった。流路内での細胞培養に関しては、図に示す通り、左のレーザー照射なしの場合に比べて、右のレーザー照射ありの場合で、細胞が流路の全体的に存在しつつ扁平形に変化したため、良好に接着している様子が確認された。これらの結果より、超音波により壁面に押し付けられた細胞がその状態のまま増殖し、血管のような構造体を形成できる可能性があることが分かった。

レーザー照射条件に対する流路内での細胞培養結果 (左レーザー照射なし、右レーザー照射あり)

