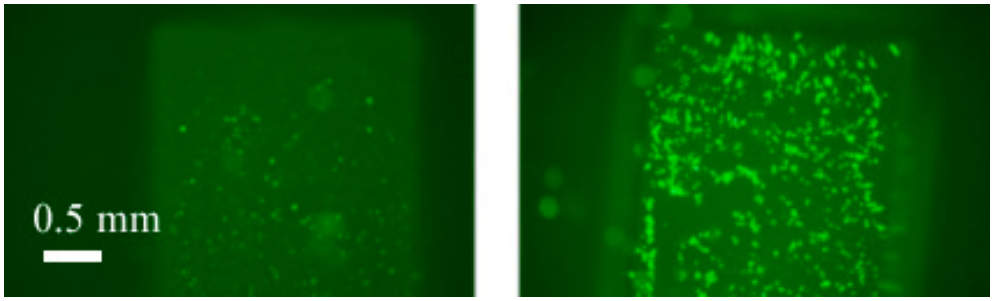
95　微小気泡と音響放射力による3次元血管形成技術の開発	桝田　晃司

【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、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、ウシ由来の頚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、左のレーザ照射なしの場合に比べて、右のレーザ照射ありの場合で、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。

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



95. 微小気泡と音響放射力による 3 次元血管形成技術の開発

桝田　晃司

東京農工大学工学部 生体医用システム工学科

Key words：微小気泡，音響放射力，血管形成，細胞プリント，トランスデューサ

緒　言

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、薬剤の効果検証のための組織や器官の形成、関節や靭帯の再生を目的とした細胞の足場形成等が数多く報告されている。実際の生体の組織構造を再現できるため、将来的に人工臓器を構成できることが期待されている。一方、適切な細胞の形態や分化を促すためには、栄養や酸素を供給する血管の構成が不可欠であり、臓器に合った 3 次元形状の血管が必要となるにも関わらず、現状のバイオプリンタでは細胞の積層が基本であるため、任意形状の血管を製作できない。また 3 次元的に張り巡らせた針上に細胞を配置するプリンタもあるが、壁厚 1 mm 以下の 3 次元形状の血管は形状と強度調整の観点から困難である。このような現状を踏まえ代表者は、これまで研究してきた音響放射力によって微小物体を動態制御する技術を応用し、血管内皮細胞を、特に分岐を有する 3 次元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して、本研究を提案する。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、細胞の空間的密度を制御し、任意形状の血管形成技術を開発する。本研究では、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

1. 使用した細胞、微小気泡

本研究では、ウシ由来の頚動脈正常血管内皮細胞（HH 細胞）を用いた。HH 細胞は細胞表面にαVβ3 インテグリンが発現しており、cRGD ペプチドがよく結合する。また、細胞周囲にはペリサイトと呼ばれる血管周囲細胞等の支持細胞が付着している。培地は D-MEM (High Glucose) に抗生物質としてペニシリンーストレプトマイシン溶液を 1%、FBS を全体量の 10%になるように加えて研究室内で作製した。微小気泡は、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いただいた Lipid bubble［1，2］に、cRGD ペプチドを付着させたものを使用した。比較対象として、同ペプチドを付着させない状態の微小気泡も用いた。cRGD ペプチドが付与された微小気泡は、HH 細胞の表面に存在しているインテグリンと特異的に結合する性質を持つ。

2. 超音波照射に対する細胞生存率の変化

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、微小気泡が存在しない場合と存在した場合で生存率を計測、比較した。図 1 に実験系を示す。中心周波数が 3 または 5 MHz のトランスデューサを恒温槽底部に固定し、ウェルプレート内に注入した懸濁液に音波を照射した［3］。この際、トランスデューサの表面から音場焦点までの距離に合わせて、図中の d=65 mm とした。各穴には、総細胞数 1.0×10^4 個となるように調製した凝集体の懸濁液を 100 μl 注入した。超音波の照射後、細胞の生死判定のための試薬（CCK-8）を注入し、吸光度を計測することによって、生存している細胞数を推定した。また同時に、生存率を算出した。

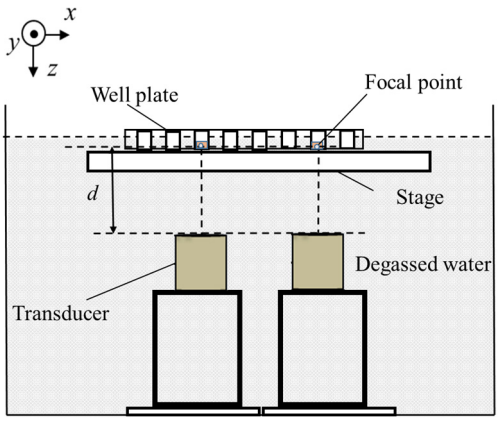


図 1. 実験系の概略

水槽底面に超音波音源であるトランスデューサを 2 個配置し、水面に設置されたウェルプレート中の細胞懸濁液に対して、任意の条件の超音波を照射することができる。

3. 流路の表面状況による細胞培養への影響

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。図 2 に示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に、細胞数 60×10^4 個の細胞懸濁液を注入し、培養を行った。この流路の表裏両面をアクリル板ではさむことで、流路を形成する。なお、細胞懸濁液を注入する際にはコネクタ部にチューブを接続する。培養を行う際には流路を培地に浸すようにし、十分な培地を添加することで細胞増殖への影響が出ないようにした。懸濁液注入後 24 時間以内に、正立顕微鏡にて流路内を経過観察した。

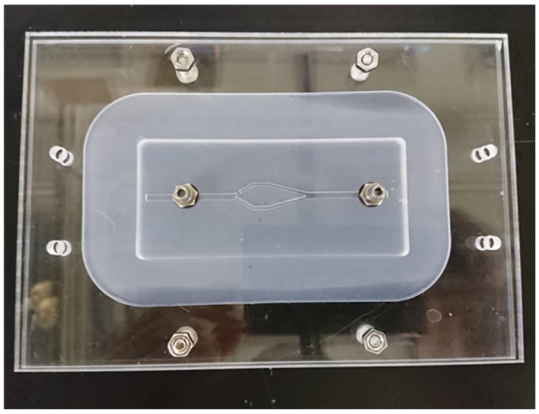


図 2. 人工流路の外観

シリコンにより形成した流路で、分岐構造を有している。流路の内径は 2 mm である。

結果および考察

1. 超音波照射条件と細胞生存率

図 3 は、微小気泡が存在しない場合の、超音波の照射時間に対する細胞生存率の推移であり、右は 3 MHz、左は 5 MHz の結果である。超音波の音圧は、過去の研究で細胞の動態制御が良好に確認された、300 または 400 kPa とした［4］。ここで Duty ratio（Duty 比）とは、音波が照射と休止を繰り返している条件において、その繰り返し周期に対する照射時間の比であり、100%の場合は連続照射を意味する。これから、どちらの周波数でも 60 s までの照射時間による生存率は 95%以上であった。つまり、音波単独では細胞に対する影響は見られないことが分かった。

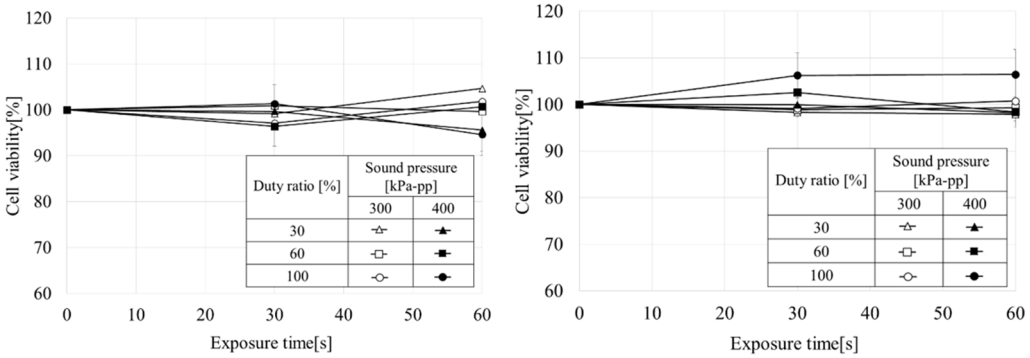


図 3. 微小気泡が存在しない場合の生存率の変化
左は3 MHz、右は5 MHzの場合である。いずれの周波数でも、照射時間に関わらず、細胞の生存率はほぼ変化しないことが確認された。

次に、上記懸濁液中に cRGD ペプチドが付与されていない微小気泡を混入させた場合の、細胞生存率への影響を調べた。図 4 は、脂質濃度 300 μg/mL にて微小気泡を調製した場合の生存率の変化を示す。3 MHz の超音波照射時には照射時間が長くなるほど生存率が低下した。また音圧が高いほど生存率が低下する傾向にあった。しかし、5 MHz の超音波を照射した場合にはこれらの傾向は見られず、3 MHz の超音波照射時よりも生存率が高くなった。

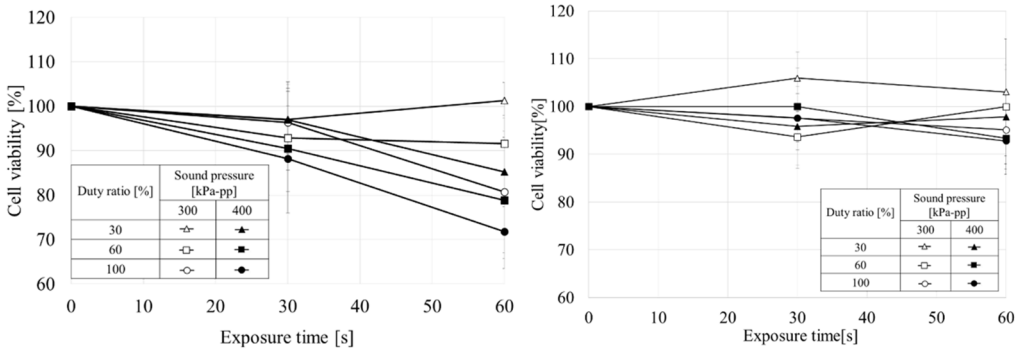


図 4. cRGD ペプチドが付与されていない微小気泡を用いた場合の生存率の変化
左は3 MHz、右は5 MHzの場合である。細胞の周囲に浮遊した微小気泡が細胞にダメージを与えるため、特に3 MHzでは、照射時間に伴って生存率の減少が顕著であった。

次に、cRGD ペプチドが付与された微小気泡を用いた結果を示す。リガンド以外の条件は上記と同様である。図 5 に照射時間に対する生存率の変化を示す。3 MHz、5 MHz どちらの周波数でも、生存率に大きな差はみられなかった。また、音圧による生存率の変化も無く、いずれのパラメータでも生存率は 93%以上となった。

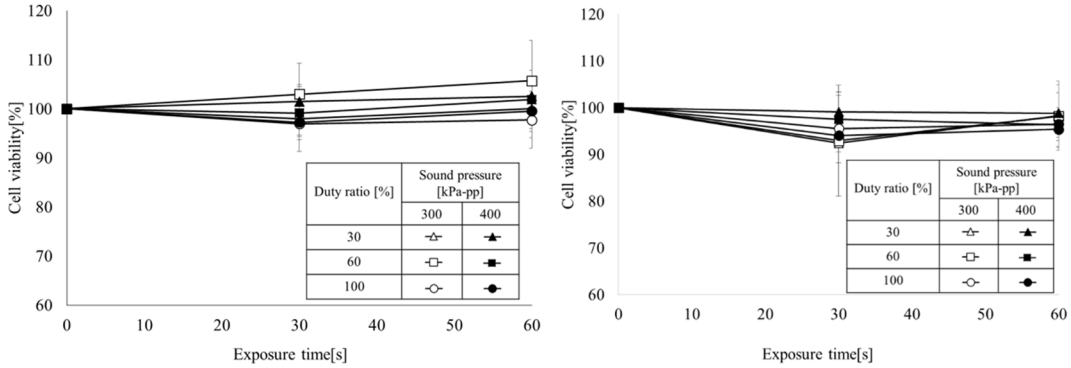


図 5. cRGD ペプチドが付与された微小気泡を用いた場合の生存率の変化
左は3 MHz、右は5 MHzの場合である。いずれの周波数でも、細胞の周囲に微小気泡が付着した状況での細胞生存率は、照射時間の増大にも関わらず、減少しないことが確認された。

以上の結果より、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。よって微小気泡が周囲に付着した細胞を超音波により制御することは、微小気泡が付着していないことよりも制御性が高いだけでなく、細胞の生存性を高める効果が期待できることとなり、本研究の今後の進展が見込まれる結果となった。

2. 流路表面への細胞培養結果

図 2 に示したアクリル板流路にコラーゲンを塗布し、超音波照射後の細胞を播種し、最大 24 時間まで培養した後に光学顕微鏡にて観察したが、細胞の接着を確認することはできなかった。これはシリコンが疎水性であるため、コラーゲンコーティングが不十分で、細胞の接着が促されないことが考えられた。そこで、エキシマレーザを流路表面に当てることで一時的に親水化し、コラーゲンコーティングと細胞の播種を行った。結果を図 6 に示す。細胞濃度は 60×10^4個とし、細胞の様子を観察しやすいよう、蛍光染色を行った。培養時間 24 時間で蛍光顕微鏡にて観察を行った結果を図 6 に示す。 左はレーザ照射なし、右はレーザ照射ありの場合である。照射なしの場合はほとんどの細胞が球形となり、接着していないことが確認された。一方で照射ありの場合、細胞は流路の全体的に存在し、扁平形に変化し接着している様子が確認された。一連の結果より、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。

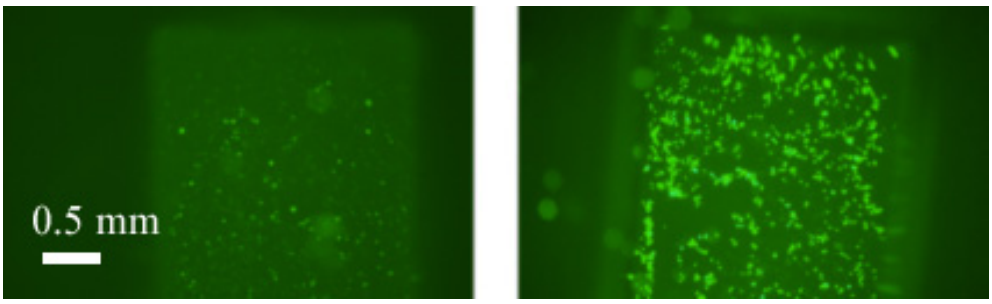


図6. レーザ照射条件に対する流路内での細胞培養結果
蛍光顕微鏡での観察画像。左は流路に対してエキシマレーザ照射なし、右は照射ありの場合で、細胞が増殖できていることがわかる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である帝京大学薬学部の鈴木亮教授に深く感謝申し上げます。

文　献

1) Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, Mutoh M, Ishiguro N, Utoguchi N, Shinohara A, Eriguchi M, Yanagie H, Maruyama K, Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome, Int. J. Pharm. 2008 Jan 4;346(1-2):143-50. PMID: 17640835　DOI: 10.1016/j.ijpharm.2007.06.010

2) Negishi Y, Hamano N, Tsunoda Y, Oda Y, Choijamts B, Endo-Takahashi Y, Omata D, Suzuki R, Maruyama K, Nomizu M, Emoto M, Aramaki M, AG73-modified Bubble liposomes for targeted ultrasound imaging of tumor neovasculature, Biomaterials, 2012 Oct 22; 34(2):501-507. PMID: 23088840 DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.09.056

3) Seki M, Otsuka T, Oitate R, Masuda K, Unga J, Suzuki R, Maruyama K. Viability validation of therapeutic cells according to surrounded amount of microbubbles and ultrasound exposure condition, Jpn. J. Applied Physics, 2019;58:SGGE13. DOI:10.7567/1347-4065/AB19AB

4) Oitate R, Otsuka T, Seki M, Furutani A, Mochizuki T, Masuda K, Suzuki R, Maruyama K, Acoustic field sweeping for active induction of bubble-surrounded T-cells, Japanese Journal of Applied Physics, 2018 June 5;57: 07LF10. DOI:10.7567/JJAP.57.07LF10