Cell stimulation with nano vibration

06NM437R 橋本 健児

1. 緒言

我々は振幅ナノメートルオーダ、周波数可聴域の振動(ナ ノ振動)が細胞の種々の機能に影響を与えることを見いだ し、再生医療等への応用を目指して研究を進めている。よ り詳細な細胞への振動の影響を調査するには、細胞にナノ 振動刺激を与えるナノ振動細胞刺激装置の振動振幅の増大 と再現性の向上が必須である。そこで、低周波数域での振 動振幅がより大きく、再現性の高いナノ振動装置を考案・ 開発した。また、ナノ振動刺激が細胞に与える影響因子と して、細胞膜近傍の剪断応力に着目し、2次元非定常流体 解析を行い、水平方向の振動負荷時における細胞膜近傍の 剪断応力を推定した。さらに、定常流による剪断応力で血 管内皮細胞が流れに沿って伸展・配向する報告から、細胞 にナノ振動刺激を与えて振動方向に配向するかを調査した ので報告する。

2. 新機構のナノ振動細胞刺激装置

Fig.1 に今回開発した新機構のナノ振動細胞刺激装置の 概観図を示す。本装置は、細胞に水平方向の振動を与える。 従来の両支持構造から片支持構造にする事で、振動駆動部 内のピエゾ素子に過大な圧縮力が付荷されないため、振動 振幅を増加させられると考えた。装置の構造は振動駆動部 をシャーレ架台に接続し、シャーレ架台の反対側を自由端 とした。片支持で装置を駆動するにはシャーレ架台を戻す 力が必要となるため、振動駆動部内に皿ばねを3枚直列で 組み込む事で戻り力を与える事にした。また、装置に静電 容量型変位センサを取り付ける事で、各振動周波数での振 動振幅の自動調節を行うためのセンサとして用いた。さら に、シャーレ架台と振動駆動部は面圧力で固定するシャフ トホルダを用いて接続した。

Fig.2 に開発した装置の振動特性を示す。Fig.2 より、低 周波数域での振動振幅は 800 nm であり、両支持構造のナ ノ振動細胞刺激装置よりも振動振幅が 16 倍に増大した。ま た、共振周波数は 800、2k、4k、8k、10k Hz であった。

また、ナノ振動細胞刺激装置の自動調節は、ドライバ装 置の回路内の制御プログラムで行っている。制御プログラ ムは、センサで読み取った信号を基準信号と比較し、それ を基に波形のゲイン調節を行っている。Fig.2の振動特性を 基にして、設定振動振幅に対するセンサの信号を基準信号 とし、制御プログラムに書き込んだ。設定振動振幅は 0 ~ 500 nm とし、設定振動周波数は 100 ~ 10k Hz とした。



Fig.1 New structure Fig.2 vibration characteristic nano cell stimulation vibration device

3. <u>実験</u>

3.1. 振動振幅自動調節時のナノ振動細胞刺激装置 の動作応答

指導教員: 增澤 徹 教授

ナノ振動細胞刺激装置の自動調節時の動作応答を確認し た。実験は、各振動周波数でのシャーレ架台の振動振幅を 測定し、指定した振動振幅と実際の振動振幅との誤差を求 め、自動調節について評価した。実験は、自動調節の動作 応答の再現性を見るために、測定毎にシャーレを付け直し た。また、基本応答特性を計測した日を0日目とし、7日 目まで計4回測定した。

3.2. ナノ振動負荷時の細胞膜近傍の剪断応力解析

解析は、CDAJ社のSTAR – CDを用いて、有限体積法に より行った。接着時の細胞は半円形状であるが、その後扁 平形状になることから、解析モデルは半円形状の細胞と扁 平形状の細胞を考えた。Fig.4(a)に細胞が半円形状のモデル とFig.4(b)に扁平形状のモデルを示す。Fig.4(a)、(b)より半 円形状モデルの細胞の大きさは半径 5 µm とし、扁平形状 モデルの細胞の大きさは半円形状の細胞の高さの半分とし た。解析領域は一辺 100 µm の正方形の領域とし、その領 域を一辺当り 1000 メッシュとした。解析を簡単に行うた めに、細胞を剛体とし、細胞は底面に接着していると仮定 した。流体は水、流れは層流とし、温度はインキュベータ 内の温度と同じく 37 ℃として解析を行った。本解析にお いて設定振動周波数と振動振幅は Table.1 に示す。本解析条 件は、本研究室で開発した両支持構造のナノ振動細胞刺激 装置の振動特性から決定した。

Table.1 vibration frequency and total amplitude by using analysis

開発したナノ振動細胞刺激装置は sin 波で振動させている ので、振動振幅を A、振動周波数を f とすると、振動の変 位 y(t)は式(1)のようになる。振動の速度 v(t)は式(1)を時間 微分して式(2)のようになる。

$$y(t) = A \sin(2\pi f \cdot t) \cdots \cdots \cdots (1)$$
$$v(t) = 2\pi A f \cos(2\pi f \cdot t) \cdots \cdots (2)$$

非定常解析は、式(2)に Table.1 の振動周波数と振動振幅を 代入し、式(2)をモデル両側面の周期境界に入力することで、 シャーレの底板を振動させるのと同じ効果を解析した。求 める剪断応力は、解析結果から得られた流速とその位置と 壁面との距離を式(4)に代入して算出した。

$$\tau = \mu \frac{du}{dy} \cdots \cdots \cdots \cdots (4)$$

 τ [Pa] : shear stress μ [Pa • s] : viscosity u [m/s] : flow velocity y [m] : distance form wall surface

3.3. ナノ振動負荷時の細胞配向評価実験

細胞にナノ振動刺激を与えた時の細胞の配向を評価するために、細胞にナノ振動刺激を与える実験を行った。実験

には、ウシ正常大動脈血管内皮細胞 (NM – 1)を使用した。 細胞に与える振動は、振動周波数を 1k Hz とし、振動振幅 を 200 nm とした。解析結果から、動脈内に働く剪断応力 と同程度である振動とした。実験は、細胞を播種した 6well 細胞培養シャーレ 2 枚のうちの 1 枚に振動を与え、もう 1 枚に振動を与えなかった。振動負荷時間は 120 時間とし、 インキュベータ内(温度 37℃、湿度 100%、CO₂濃度 5%) で、24 時間毎にシャーレの中央を撮影した。評価方法とし て、写真から無作為に細胞を 100 個選び、細胞の伸展の方 向と振動方向とのなす角度 θ を求めた。

4. <u>結果と考察</u>

4.1. 振動振幅自動調節時のナノ振動装置の動作応答

Fig.3 に自動調節時の指定した振動振幅と実際の振動振幅との誤差を示す。Fig.3 より、7 日目までの結果から、振動周波数 700 Hz までの誤差が±10% 以内であった。しかし、2k Hz 以上の振動周波数において誤差が 40%になった。以上の事から、シャーレを付け直しても振動周波数 700 Hz までは安定した振動振幅自動調節が行えていると示唆される。



Fig.3 Error of instruction value and measurement value 4.2. <u>ナノ振動負荷時の細胞膜近傍の剪断応力解析</u>

Fig.4(a)、(b)に半円形状と扁平形状モデルの速度ベクトル 線図を、Fig.5 に各振動周波数における細胞膜近傍の最大剪 断応力を示す。体内に働く剪断応力が一番大きいと思われ る代表的な動脈の直径を2 mm、血流を0.5 m/s、血液の粘 度を3.217×10⁻³ Pa·s、動脈内の流れをポアズイユ流れと仮 定した場合、単純な理論計算から得られる動脈の内壁面近 傍の剪断応力は0.7 Pa である。一方、振動周波数1k Hz 以 上のナノ振動負荷時の解析結果より、半円形状・扁平形状 両モデルにおいて最大剪断応力は、細胞上部において1.0 Pa 以上になる事を確認した。これより、ナノ振動負荷時の 細胞膜近傍の剪断応力は動脈内壁面に働く剪断応力と同程 度であることが分かった。





また最大速度は、振動周波数 10, 100, 1k Hz において、半 円形状モデルの場合は細胞から約 2.5 µ m 上部に、扁平形 状モデルの場合は細胞から約 2.0 µ m 上部に発生していた。 振動周波数 10k Hz において、半円形状モデルの場合は細胞 から約 8.0 µm 上部に、扁平形状モデルの場合は細胞から約 7.0 µm 上部に発生していた。



4.3. <u>ナノ振動負荷時の細胞配向評価実験</u>

Fig.6に培養時間120時間後におけるシャーレ中央での各 角度θに対する細胞数のヒストグラムを示す。Fig.6(a)は振 動無負荷のデータであり、Fig.6(b)は振動負荷のデータであ る。Fig.6より、振動無負荷・振動負荷時の細胞において、 各角度θに対する細胞数に大きな差がないことから、細胞 にナノ振動を与えても NM - 1細胞は振動方向に対して配 向しないことを確認した。振動方向に対して配向しなかっ た原因として、細胞にかかる剪断応力の方向が一周期毎に 逆転しているためと考えられる。しかし、実験は1回しか 行っていないため、さらに実験を行い、細胞の配向につい て検討する必要がある。



(b) Oscillatory load Fig.6 Histograms of cell number to degree θ (at center of dish)

5. <u>結言</u>

ナノ振動細胞刺激装置の性能向上を図るため、装置の新 機構を考案・開発をした。振動周波数700 Hz まで安定した 振動振幅自動調節が行えた。また、ナノ振動負荷時の細胞 膜近傍の剪断応力解析により、ナノ振動により生じる剪断 応力は動脈内に生じる剪断応力と同程度である事が予想さ れ、ナノ振動が細胞に与える物理的刺激の1つと示唆され た。しかし、ナノ振動負荷時の細胞配向評価実験により、 ウシ正常大動脈血管内皮細胞にナノ振動刺激を与えたが、 今回は振動方向に対して配向しなかった。今後、さらなる ナノ振動刺激による細胞の配向について検討を行う必要が ある。