

培養神経細胞の伸長方向制御と衝撃引張りひずみ負荷試験装置の設計製作

国立東京工業高等専門学校 ○芦原 直也, ◎角田 陽
首都大学東京大学院 青村 茂, 中橋 浩康

要旨

本研究は培養神経細胞の衝撃ひずみ試験により、細胞1個単位での衝撃に対する損傷評価を行い、頭部外傷発症メカニズムを解明することを最終目的としている。一般に、培養細胞の伸長方向に規則性はなく、かつ細胞数増加のために観察が困難であり、定量的な損傷評価を行うことが難しい。そこで、本研究では微細加工を用いて細胞の数量や伸長方向の制御をし、各細胞の方向を考慮した衝撃ひずみ実験が可能な専用の装置の設計・製作・検証を行った。

1. 緒言

不慮の事故による日本国内の年間死亡者数は約4万人にも及び、全死因のうちの第6位にのぼる。中でも頭部外傷を引き起こす主要な原因である交通事故や転落・転倒による死亡者は約1万4千人にも及び、頭部外傷は死因として多くの割合を占めている。本研究では、頭部外傷のうち、特にびまん性軸索損傷 (Diffuse Axonal Injury: DAI) に着目する。DAIは脳幹部の神経細胞軸索の損傷を特徴とする脳損傷であるが、明白な病理所見を持たず、診断が困難であり、また、その発生メカニズムも明らかではない。現状では、DAIは脳幹部の軸索損傷の痕跡を検出するという方法で診断が可能であるが、損傷部位の特定が困難であるため、見過ごされやすい。そのため、外部衝撃と神経細胞損傷との関係を解明し、DAIの発生を予測することが救命医療や法医学診断上の課題となっている。

本研究では、培養神経細胞を使用して衝撃試験を行うことで、細胞1個単位での衝撃に対する損傷評価を行い、DAIの発生メカニズムの解明をはかることを最終目的としている。

先行研究では²⁾、リソグラフィ技術を用いて作製した細胞のサイズにあわせた微細凹凸形状により、PC12細胞の2次元方向の培養方向制御を可能にしている。ここでは、広い溝幅形状の方が、細胞の伸長度が高くなること示され、15から20 μm での培養が最適だとしている。そして、PC12細胞の樹状突起を一定方向に制御して培養することを可能としている。また、培養したPC12細胞を用いた衝撃に対する損傷評価も行い、一定の結果が得られている。

しかし、実験装置の動作の精度が細胞のサイズに比して大きく、実験の正確性の面ではやや不十分であると考えられるなど、実験全般に改良の余地があると思われる。そこで本研究では、実験装置全般の見直しをはかり、衝撃ひずみ負荷精度の改善、細胞培養面の改善などを行い、より精度の高い衝撃ひずみ実験装置の設計・製作・検証実験を行うことを目的とする。

2. 衝撃ひずみ実験装置

衝撃ひずみ実験全体の概要をFig. 1に示す。衝撃ひずみ負荷試験装置は、培養した細胞に衝撃を加える装置であり、ひずみ速度とひずみの関係を実験的に解明するための装置である。当装置に連結して、ひずみ速度をコンピュータで制御したアクチュエータで発生させる。細胞チャンパー部(Fig. 1の(a)部)、細胞培養面部(同(b)部)、それに衝撃ひずみを与える変位装置部(同(c)部)及びアクチュエータ部(同(d)部)に大きく分けられる。実際の衝撃を模した速度と変位量をアクチュエータで発生させ、変位装置部を通じてチャンパーにひずみ量を与え、その際のチャンパー内の細胞の状況を調べる。先行研究においても同様の構成であったが、本研究では、まずは変位装置部の改良、細胞培養面の改良、細胞培養方法の改善を検討した。

3. 衝撃ひずみ負荷試験装置の改良

既存の装置では、衝撃方向の移動動作精度及びひずみ量の設定精度が十分ではないとみうけられた。そこで、Fig. 2に示すように、直動転がり案内によって移動方向を1方向のみに拘束することで、移動動作精度を高めることとした。さらに、より精度の高いひずみ量の設定を行えるようにマイクロメータによる位置設定機構を付加することとした。

本改良装置の性能評価として、ひずみ発生方向(x)に対して、その水平垂直方向(y)及び鉛直方向(z)の変位の各ずれ量をレーザ変位計(キーエンス, LK-G500)を用いて評価をした(Fig. 3)。近似線はx方向に1 mm変位するごとに、y方向には平均して約2.68 μm 、z方

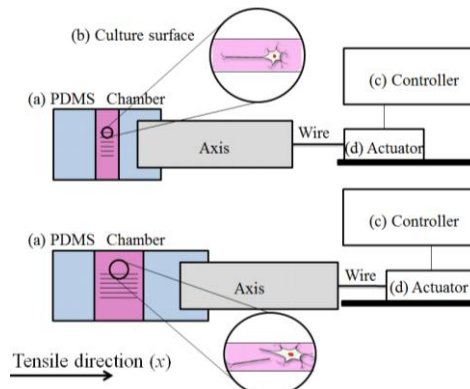


Fig. 1 Concept diagram of the shock strain experimental device

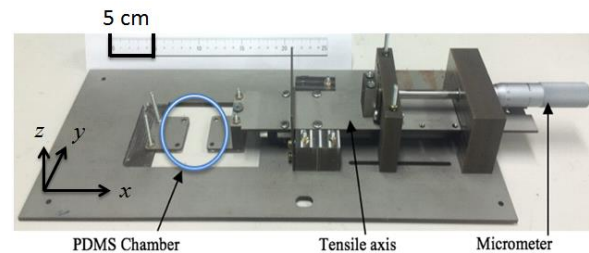


Fig. 2 Schematic diagram of the impact load device

向には平均して約0.16 μm ずれていく。この各方向の近似線の傾きは、直動案内を取り付ける際に生じたずれに起因すると考えられる。一方、z方向にはほとんどずれ量は見られず、x方向に30 mm変位を与えた際も、最大で5 μm 程度のずれ量であった。細胞は実験時に200 μm ほどの大きさにあることや実際の試験時のひずみ負荷方向の変位は現状で最高10 mmであり、本改良装置では、その時のy方向には約30 μm 程度のずれ範囲に収められることになる。すなわち、本改良装置はひずみ変位を1方向のみに高精度で与えられることができ、細胞試験がより正確に行えるようになったと考えられる。

また、動作の繰り返し再現性を確認するために、往復10, 20, 30 mmの範囲の各動作を10回繰り返した際のy及びz方向の誤差について調べた結果をTable 1に示す。細胞の大きさに比べてばらつきは小さく収まっているといえる。

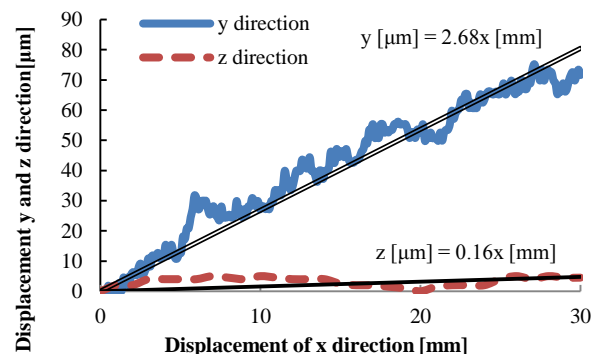


Fig. 3 Results of measurement displacement

Table 1 Repeatability and reproducibility of positioning

	Displacement of x direction		
	10 mm	20 mm	30 mm
Y direction	19~32 μm	45~70 μm	60~82 μm
Z direction	-2~4 μm	-1~4 μm	0~6 μm

4. 細胞培養面作製手法の改良

4.1 細胞培養面作製方法

細胞の伸張方向を制御するための微細形状については、単結晶Siの基板の上にレジスト材 (SU8 3025, SU8 3050) を塗布し、リソグラフィにより微細凹凸形状を作製した。形状作製工程と加工条件をFig. 4に示す。

1. Cleaning process

Cleaning using Distilled Water	10 min
Cleaning using Ethanol	5 min
Cleaning using Acetone	5 min
Cleaning using Semico Clean	12 min

2. Lithography process

Resist coating using a Spin Coater	
Soft-Baked and Left at room temperature	24 hour
Exposure	30-35 sec
Soft-Baked and Left at room temperature	20 min
Development	5-10min
Hard-Baked	30 min

Fig. 4 Manufacturing process of micro groove shapes

本実験で使用するレジスト材SU8はネガ型レジストであり、露光時の感光部が現像時に残り、非感光部のレジスト材が溶ける。

膜厚 (溝高さ) が40 μm 程度の場合、5日程度の短期培養には有用だが、細胞が成長に伴い溝から出てしまい、溝外の細胞と混じり合い観察が困難になることが多い。そこで溝高さのより高い微細形状での培養が望ましい。膜厚の厚いパターンでの培養が可能になれば、長期培養での細胞の観察が容易になる。

4.2 細胞培養面形状評価

SU8 3025とSU8 3050の各塗布条件でのレジスト材の厚さを表面粗さ計によって測定した結果をTable 2に示す。これらのデータを元に、回転数やレジスト材を変えたり、また塗布を重ねることによって、指定の厚さの膜を作製できるようにした。

Table 2 Thickness of resist

	Revolution speed		
	1500 rpm	2000 rpm	2500 rpm
SU8 3025	46~55 μm	38~42 μm	33~35 μm
SU8 3050	78~85 μm	65~72 μm	48~54 μm

4.3 培養検証実験

上記で作製された先行研究よりも深い微細溝について、実際に培養の伸長具合に関する評価を行った。

本実験での培養面には、市販の単結晶Si基板上にSU-8で微細形状を作製したものをを用いた。培養面への細胞の密着性向上のために、Poly-L-lysineの塗布による表面処理をした後に、 $\phi 35$ mm、高さ13 mmのPolystyrene製dish内に培養面を設置して以下のように培養をした。なお、溝の深さは45 μm とした。培養条件としては培地細胞を加え、さらに樹状突起を伸長させるため、NGFを加える。培養は37 $^{\circ}\text{C}$ で95 % Air, 5% CO_2 のインキュベータ内で行った。実験では、24時間ごとに全ての溝中の樹状突起について、画像解析ソフトImage Jを用いて培養状態の観察測定を行った。

その結果、溝高さが高くなることにより、培地が溝の底面まで届きにくくなることがわかった。すなわち、細胞は培養面に付着することにより成長することができるが、高アスペクト比の溝では、溝壁に発生する表面張力により液体の培地と細胞が底面に届かずに、付着しないことがあると考えられた。

そこで、本研究では、この培養面に培地を入れた状態で真空装置に入れて真空引きをすることで、溝内から気泡を除去する方法を検討した。本実験では、10 mm \times 溝幅の溝15本分の基板へ付着している細胞の割合を付着率と定義し、その数量を計測した。なお、付着している細胞とは、成長をしている細胞をさす。真空引きの有無で、付着率の比較した結果をFig. 5に示す。また、同様に、

付着細胞の軸索を含めた細胞の大きさを計測し、その際の最大の細胞の大きさと最少の細胞の大きさを誤差バーで示し、真空引きの有無で比較した結果をFig. 6に示す。真空引きをした方が、付着率が向上しているといえる。高アスペクト比のパターン使用時の細胞培養には真空引きによる基板からの気泡抜きが有用であると考えられる。

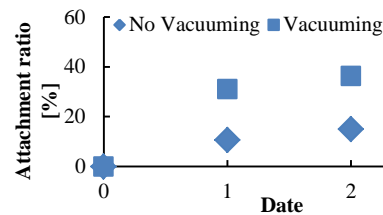


Fig. 5 Comparison of ratio of attachment with vacuum and no vacuum

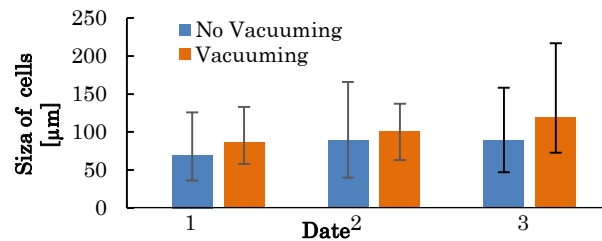


Fig. 6 Comparison of size with vacuum and no vacuum

5. 細胞チャンパー形状の改良の検討

細胞チャンパーは、中央部の微細凹凸溝部にて細胞を培養する容器であり、そのまま衝撃ひずみ実験装置に設置されて、ひずみ負荷される。材質はシリコーンゴムの一種のポリジメチルシロキサンであり、ひずみ負荷方向に変位を与えると、ポアソン比から、その水平垂直方向にも変形が生じる。これは、衝撃ひずみを与えた際に2方向からの変位が与えられてしまう可能性を示す。より正確なひずみと損傷の関係を明かにするためには、できるだけ1方向のみの変位となることが望ましい。そこで、FEM解析を用い形状の検討を行った。

既存のチャンパーはチャンパーと軸をネジ4本で留めるようになっていたが、固定部を貫通させ、面で支えるように改良した。Fig. 8は、改良前後の形状について、本来のひずみ付与方向に0.5 mmの静的な変位を加えたとき、培養部の中心からy方向に生じる変位を示している。これより、今回考案したチャンパーで水平垂直方向の変位が低減できることがわかる。1方向のみのひずみ変位が与えられる形状となったといえる。

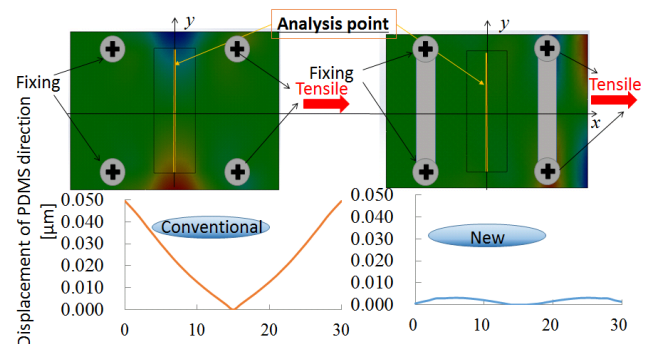


Fig. 7 Comparison of strain on new and old chamber shape with FEM analysis

6. 結言

培養細胞に対する衝撃ひずみ発生装置について、変位発生部、細胞培養部、細胞チャンパーの改良を検討し、従来よりも高精度の実験ができるようにした。今後は、実際のひずみ負荷実験や真空度とアスペクト比による伸長具合の定量的関係を解明していく。

参考文献

- 平成25年度人口動態統計, 厚生労働省
- 金子由磨ら: 衝撃ひずみを負荷した脳神経細胞の軸索損傷評価, 日本機械学会 第26回バイオエンジニアリング講演会 (2014)