

磁気ビーズを用いた細胞振動刺激装置及びナノ振動検出装置の研究開発

Cell vibration stimulator with a magnetic beads and nano-vibration detector

○ 服部圭介 (茨城大) 増澤徹 (茨城大) 林照剛 (大阪大)

Keisuke HATTORI, Ibaraki University
Toru MASUZAWA, Ibaraki University
Terutake HAYASHI, Osaka University

Abstract: We have been investigating mechanical cell stimulation which has the possibility to enhance the cell function without any chemical and biological material. Cell stimulation system using magnetic beads attached on the cell wall has been developed to investigate the enhancement of cell function with the vibration stimuli. A nano-meter order vibration detector has been developed to detect the vibration amplitude and frequency of magnetic beads. The attractive force that acts on the magnetic bead was calculated from the bead velocity in poly- α -olefin by based on Stokes' law. A reflected laser by magnetic bead was measured to detect the displacement of the bead. The maximum force act on beads is 106 pN with current of 2.0 A. It is sufficient force for the cell stimulation. A gray value of the reflected laser is the highest at the center of the bead.

Key Words: Magnetic beads, nano-vibration, cell stimulation

1. 緒言

再生医療をより一般的な治療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, 機能発現等の細胞機能制御方法の開発が必要不可欠である. 機械的な刺激が細胞機能を活性化する上で重要であることが指摘されており, 様々な研究が行われている. 我々は機械刺激の中でも超微小振動刺激に着目し研究を進めている. これまでの研究において, 振動周波数が数百から数 kHz で振動振幅がナノメートルオーダーの超微小振動 (ナノ振動) を培養細胞に付加した場合, 細胞機能活性化に影響を与えることを実証したが, 細胞機能活性の機序が振動刺激によるものか, 培養液と細胞壁面に生じるせん断応力によるものかは解明されていない. そこで, 磁気ビーズを細胞に接着し, 交番磁界を与えることにより細胞に直接振動刺激を付加する細胞振動刺激装置と, 磁気ビーズに付加されるナノ振動を検出するナノ振動検出光学系の開発を進めている. 本稿では, 細胞刺激装置の発生力測定と振動検出装置の評価を行ったので報告する.

2. 方法

2-1 細胞振動刺激装置

Fig.1 に細胞振動刺激装置を示す. コアに 400 巻きのコイルを巻き, 電磁石を形成する. 抗体抗原反応によって細胞に結合された磁気ビーズは電磁石の間隙中に配置され, 本電磁石で発生した交番磁界により細胞に結合した粒径 8 μm の磁気ビーズ (micromer[®]M) を振動させ, 細胞を直接刺激する構造とした. 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, 磁気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.

本装置は, 有限要素法解析ソフト ANSYS を用いて磁場解析シミュレーションを基に設計し, 電磁石は細胞に接着した磁気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.

製作した C コア間隙中の磁束密度は励磁電流 2.5 A のとき最大で 0.18 T 発生可能である. また, 本装置によって純水中に散布した磁気ビーズを振動周波数 100 Hz まで振動可能である.

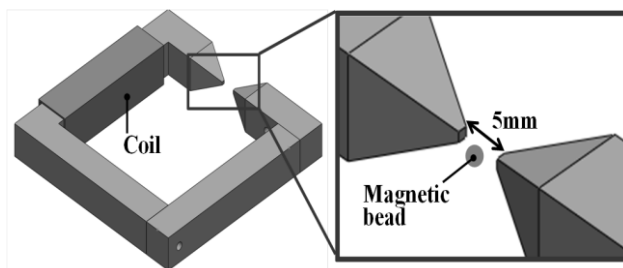


Fig.1 Cell vibration stimulator

2-2 ナノ振動検出装置

Fig.2 に製作したナノ振動検出装置を示す. 本装置は CCD カメラ, ビームスプリッター, Nd : YVO₄ グリーンレーザー ($\lambda = 523 \text{ nm}$), 対物レンズ, ステージ, フォトダイオードセンサから構成される. レーザ光を対物レンズを通して磁気ビーズに照射する. 磁気ビーズに照射されたレーザー光は磁気ビーズの振動運動に伴う位置変化に対応して反射光の光量に変化する. 反射光の光量の変化を PD 及び CCD カメラで計測することにより, 磁気ビーズの振動を検出し, 振動周波数及び振動振幅を測定する.

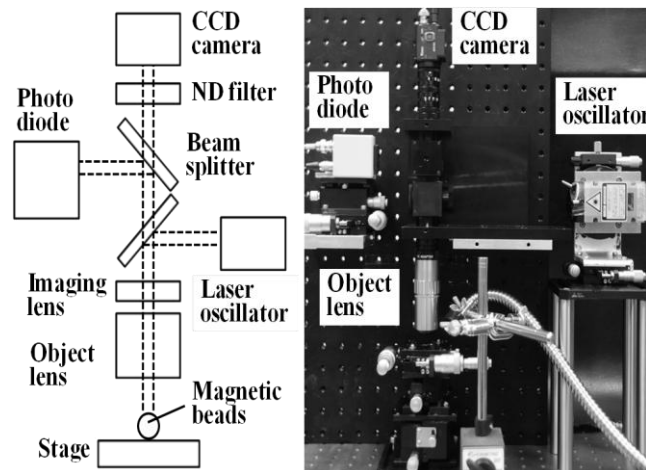


Fig.2 Nano-vibration detector

2-3 磁気ビーズに作用する磁気吸引力の測定

製作した細胞振動刺激装置が細胞に対して与える刺激強度を推定するために、C コア型電磁石が磁気ビーズに対して発生する磁気吸引力の測定を行った。Fig.3 に実験装置を示す。実験装置は細胞振動刺激装置、ナノ振動検出装置、高速度ビデオカメラから構成されている。プレパラート上のポリ α -オレフィン(粘度: η = 5.743 mPa・s)中に磁気ビーズを散布し、プレパラートをC コア間隙中に設置した。磁気吸引力を作用させた磁気ビーズの位置変化を高速度カメラで5 秒間撮影し、画像解析ソフト (Image J) を用いて撮影した画像から1 秒ごとの位置を測定し、移動距離を算出した。また、磁気ビーズの移動速度を基に、以下に示すストークスの式から磁気吸引力を推定した。

$$F = 6\pi\eta r v \dots\dots\dots(1)$$

η は磁気ビーズを散布している溶液の粘度, r は磁気ビーズの半径, v は算出した磁気ビーズの速度である。C コア電磁石先端から 0.5 μm と 1.0 μm の位置の磁気ビーズの磁気吸引力を測定し、各位置においてコイルへの励磁電流は 0 ~ 2.0 A まで変化させた。

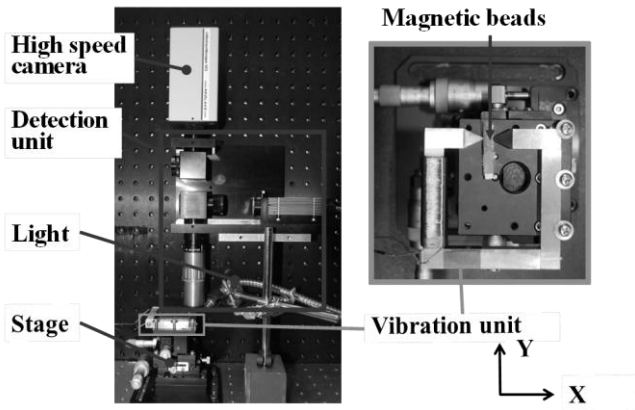


Fig.3 Experimental system

2-4 磁気ビーズの反射光測定

磁気ビーズに照射したレーザーの反射光と磁気ビーズの位置変化の対応関係の確認を行った。製作した計測装置のステージ上に、乾燥した磁気ビーズを散布したプレパラートを設置し、磁気ビーズにレーザーを照射する。ステージを X 方向に変位させ、そのときの磁気ビーズ表面でのレーザーの反射光を CCD カメラで撮影し、画像処理ソフト (Image J) を用いて撮影画像を用いて反射光の変化を測定した。レーザーの出力を 1mW とし、ステージを-X 方向に 8 μm まで変化させて、3 回測定を行った。

3. 結果及び考察

3-1 磁気ビーズに作用する磁気吸引力の測定

Fig.4 に測定した磁気ビーズ移動距離, Fig.5 に励磁電流に対する磁気ビーズに作用する磁気吸引力を示す。測定した磁気ビーズの移動距離から磁気ビーズは等速直線運動をしていると考えられ、一定の磁気吸引力が磁気ビーズに作用していると考えられる。また、製作した C コア型電磁石の先端から 0.5 μm の位置において、励磁電流 2.5 A のとき最大の磁気吸引力 106 pN を発生可能であることを確認した。最大 106 pN か 6 pN までの範囲で磁気吸引力を磁気ビーズに作用させることが可能であり、様々な強度の刺激を与えることができる。

3-2 磁気ビーズの反射光測定

Fig.6 にステージを 2 mm, 5 mm, 7 mm 変位させたときの

反射光を CCD カメラで撮影した画像を示す。Fig. 7 にはステージの移動距離に対するグレー値の平均値及び標準偏差を示す。Fig. 6 の画像から、磁気ビーズ頂点付近で反射した場合に反射光の光量が最も高くなっていることが確認できる。Fig. 7 においても、4mm の位置でグレー値が最も高くなっていることが確認できる。また、1 mm や 8 mm 変化させた場合、つまり磁気ビーズの外周付近で反射するに当たって CCD カメラに入射する反射光の光量が減少し、グレー値が低くなっている。このことから、磁気ビーズにおいて反射したレーザーの光量を測定することで磁気ビーズの位置変化が測定可能であることが示唆された。

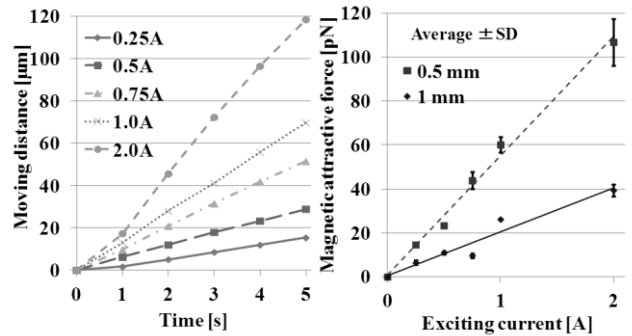


Fig.4 Measured distance Fig.5 Magnetic attractive force

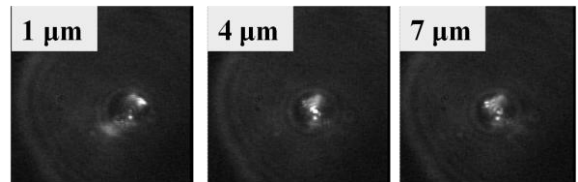


Fig.6 Magnetic bead and laser

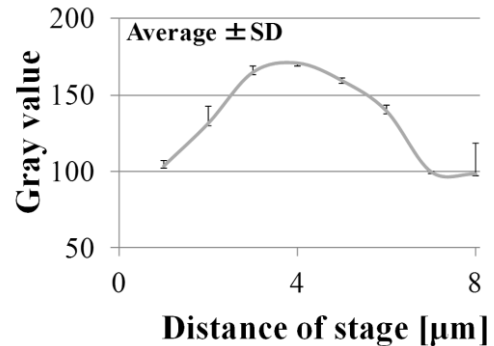


Fig.6 Gray value of laser

4. 結言

磁気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細胞振動刺激装置およびナノ振動検出装置を製作した。磁気ビーズに対して細胞刺激装置が発生可能な磁気吸引力は最大で 106 pN であった。ナノ振動検出装置を用いて、磁気ビーズに照射したレーザーの反射光を CCD カメラで撮影し、測定することで磁気ビーズの微小振動が計測可能であることを確認した。今後、実際の細磁気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。

参考文献

(1) Andreas R. Bausch, Florian Ziemann, Alexei A. Boulbitch, Ken Jacobson, and Erich Sackmann, Local Measurements of Viscoelastic Parameters of Adherent Cell Surfaces by Magnetic Bead Microrheometr, Biophysical Journal, vol. 75, pp. 2038-2049