シリコンベルトを使った 培養細胞伸縮装置の開発

日本医科大学解剖学第一講座 武政 徹
杉本啓治, 山下和雄

本研究の背景

動物の細胞は生体内では成長、運動、呼吸、心臓の拍動などによる機械的刺激に絶えずさらされている。これまで、筋肉のような能動的に力を生み出す側の組織・細胞の研究は盛んに行われてきたが、受動的に力を受けた細胞がどのように反応しているかについての研究は少なかった。我々はそのような問題に興味を持ち、機械的張力刺激を受けた細胞の細胞骨格、特にアクチン繊維束からなるストレスファイバーに注目して研究を進めてきた^{1), 2)}。

実験対象の選択 (ヒト臍静脈血管内皮細胞を選んだ理由)

従来の我々の研究では生体から取り出した組織をそのまま実験に使うことが多かったのだが、最終的な目的である分子レベルでの解析を行うためには組織中の細胞集団はヘテロ過ぎると考えた。そこでまず種類の細胞に絞って培養細胞系を樹立し、それをエラスティックな基質上で培養した後、律動的な伸縮刺激を与えてみることにした。対象として選んだのは血管内皮細胞という血管内腔を数石状に覆っている扁平な細胞で、培養系に移してもしばらくはこの形態を維持している。扁平な細胞は、刺激に対する細胞の形の変化や細胞内の構造変化も容易に観察できるので形態学的な研究にはとても便利である。細胞の由来はヒトの臍帯 (へその緒) の静脈である。私はこの材料が妊婦さんとのインフォームドコンセントを取ることさえでき

ればとても良い材料だと考えている。ウシやブタの大動脈などの分離状況に比べれば格段にきれいな (バクテリアのコンタミネーションが少ない) 状態で材料は採取可能だし、何しろ廃物利用で、動物の殺傷を伴わないというのも気に入っている。欠点としては継代培養するとエイジングがかかって、とたんに形が悪くなり、基質面との接着力も落ちてしまうという特徴が挙げられる。ヒト臍静脈血管内皮細胞には感染症の有無をチェックして、使う人の安全性を考えた市販品もある。しかしその半面、出荷前に何代か植えついでいるので、研究者の手元に着くころにはすでに形も悪く、基質への接着力も落ちており、本研究のような目的で使うには不適當である。よってここでは、本学付属病院の産婦人科の品川寿弥先生の協力のもとで、妊婦さんにインフォームドコンセントを取り、自ら分離したフレッシュなものを使うことにした³⁾。

培養細胞伸縮装置開発のいきさつ

次の問題はどのような方法によって細胞を伸展させるかである。例えば市販の機械 (Flexercell: 米国 Flexcell 社) では、底がシリコン膜でできているシャーレを下から吸引してへこませる事で、その上に培養してあった細胞を基質ごと引き伸ばす機構を採用している (図1A)⁴⁾。この装置には、後で指摘するように本研究のような目的の実験を解析する上での問題点があるのだが、まず価格が高い (システム一式が400万円近くする) というのが実は当時導入に踏み切れなかった大きな理由であり、仕方なく装置を自作することにした。

図1 各種デバイスによるシリコン膜の伸展の様子 (平面図)。A: 市販のデバイス (Flexercell) の場合。C→B: 一般的な一方向性伸縮デバイスの場合。元の状態のシリコン膜 (C: 正方形) を縦に倍に引き伸ばすと (B) 糸巻き型変形を生ずる。C→D: 今回開発したデバイスの場合。伸展時、伸展方向と直交する方向には均一に圧縮がおこる (D)。

Silicone belt system for cyclic stretching of cultured cells

Tohru TAKEMASA, Keiji SUGIMOTO and Kazuo YAMASHITA

Department of Anatomy I, Nippon Medical School (takemasa@nms.ac.jp)

基質の選択について（シリコン膜をベルト状にした理由）

培養細胞を引き伸ばす機構にはタイプがいくつかあるが、それらについてはすでに総説があるのでそちらを参照されたい³⁾。デバイスを自作している人の中では一方向性の伸縮刺激負荷装置を採用している人が多かった。すなわちシリコン膜の両端をクリップで固定し、それを引っ張るのである（図1C→B）。ここで引き伸ばされたシリコン膜には糸巻き型の変形が生じていることに注目していただきたい。これは、シリコン膜を引っ張った場合、その方向への伸展に加えてそれと直交する方向へ圧縮が同時に起きていること、さらに、端が固定されていることに起因している。したがってこのようなデバイスでは伸展と圧縮の両方が起きているのだが、Flexercellのような伸展方向が放射状のデバイスに対比して、習慣的に「一方向性の伸縮デバイス」という言葉が使われている。なお、最近ではシリコン膜の周辺部を厚くすることで20%ぐらいまでの伸展率ならば圧縮は無視できるほど小さく押さえられるデバイスも開発されている（名古屋大学・成瀬恵治先生、私信による）。

私ははじめはこうした一方向性の伸展方式を踏襲しようとした。まずシリコン膜の調達であるが、「自作するより何か代用品を」と考え「伸縮性のある薄い膜でできた製品は・・・」と思いめぐらした時、日本が世界に誇るあの製品のことが頭に浮かんだ。幸いその大手製造会社が大学の近くにあったこともあって、すぐに相談にうかがい見本品も手にすることができた。ところがコンドームはラテックスゴムという天然素材でできているため不透明で（オートクレーブ滅菌するとさらに不透明度が増す）顕微鏡観察用の基質としては不適当であることが判った。流用は断念せざるを得なかったが、わざわざメーカーまで足を運んだ甲斐もあった。「どんな実験に使うのですか」といぶかしそうに尋ねる会社の人の質問に「コンドームを輪切りにしてさらに切り開き、その上に細胞を培養してから両端をクリップで固定して・・・」と話している自分の言葉で気がついたのである。どうせくつつけるならコンドームの輪切りのまま、すなわちベルト状のシリコン膜に二本のロッドを挿入してそれを左右に引っ張ればよいのではないかと、というアイデアが浮かんだ（図2, 図1C→D）。実はシリコン膜片を強い力で引き伸ばしても外れないようにクリップで止めるのは意外に難しく、かつ滅菌状態を保ちながらこのような操作をするのはわずらわしい事だったのだが、この方式を採用す

ることによってそれらの問題は解消されたのである。またこれは後述するような本デバイスの、他のデバイスでは実現できない優位な点を特徴づけることになる。さらにコンドームの製法を聞くことでシリコンベルト作製の工程もはっきりした。

シリコンベルト作製の実際とその特徴

シリコンはダウコーニング社の Silpot 184W/C を使用する。水飴状の本体10に対して触媒1を加えガラス棒を用いてよく混合し、そのあと吸引ポンプを使って十分に脱気する。試験管のような形に加工したアクリル棒をこの中にディッピングしてすぐに逆さまに立て、しばらく放置して余分の未硬化シリコンを自重で落とす。あとは65度で6時間かけて熱硬化させ、その後は靴下を脱がすように剥がせば、まさしくシリコン製のコンドームのでき上がりである。実際使うときにはこれを適当な大きさに輪切りにすればシリコンベルトとなる。初めは本物のガラス試験管を型として用いていたが、硬化したシリコンがうまく剥がせないために苦勞した。素材とテンプレートの組成を考えれば当然のことであり、シリコンと仲の良くない材質の型を選ぶのが肝心である。また、さまざまな大きさのテンプレートを取りそろえることでそれに相当する大きさのシリコンベルトを簡単に自作することができ、例えば細胞観察用には小さいもの、生化学分析用には大きなものと使い分けることができる。切り分けたシリコンベルトはエタノール中に保存し（滅菌にもなる）、使用前日に定法に従い適当な細胞外マトリックスで表面コーティングを施す。

伸展はシリコンベルトに2本のロッドを挿入し、それらの間隔を拡げることで実現する。縦じまのないシリコンベルトは引き伸ばしても切れにくく、うまく作ると200%ぐらいまで破断せずに伸展できるベルトになる。でき上がったシリコンベルトを使ったデバイスには既存のデバイスとは異なる次のような特徴がある。通常の一方向性の伸縮デバイスではシリコン膜の両端は引っ張っても離れないようにきつく固定されているため、前述のように伸展時に糸巻き型の変形が生ずる（図1C→B）⁴⁾。しかし本デバイスではシリコンベルトの両端はロッドに引っかかっているだけで固定されておらず（図2）、伸展時にシリコンベルトはその上をスライドするので変形は一樣に起こり、生体の組織をより自然に模倣することができる（図1C→D）。すなわち細胞はシリコンベルトの上のどこにいても同じ伸展率、同じ圧縮率の均一な変形を受けることになり、この二つのファクターと細胞応答の相関を探るのに有

利である。Bのようなひずみ場では場所によって圧縮率が変わってくるし、Aに至っては伸展率さえ場所によって異なっている（伸展されるのはシリコン膜の周辺部のみで、中央部はほとんど伸びていない）⁴⁾。生理・生化学的な研究をする際、これら既存のデバイス上の細胞を均一の刺激を与えた出発材料として扱うことができるかどうかは、はなはだ疑問である。

伸縮装置の設計・製作とその特徴

要するにシリコンベルトに挿入したロッドを左右に繰り返して動かす工夫である。「ある程度のトルクでロッドを左右に動かせ、しかも正確に位置決めができるものは・・・」と部屋の中を見回すと、インクジェットプリンターの印字ヘッドの動きを制御しているモーターが目に入った。このモーターはステッピングモーターといい、電源とつなげば回るというタイプのものではなく、例えば信号を1パルス送ったら1.8度回転するという動作の仕方をする。時計回り、反時計回りの設定も自由である。秋葉原のジャンク屋でモーターを安く買い、コントローラーも自作してみたものの、トランジスタ類をハンダ付け作業で傷つけてしまったのか動きが少しぎこちない。仕方なく専用のコントローラーを求めてモーター会社（日本サーボ株式会社）まで乗り込んだ。運良く工作好きの営業の方と知り合うことができ、設計だけこちらがすれば機械部分の細工は任せられることになった。初めはまさにプリンターにあったようにタイミングベルトを応用しようと考えたのだが、それよりボールねじを使った機構の方が安定しているという情報もあり、作ってみたのが図2にあるような培養細胞伸縮装置（開発コードネーム：のび太君、特許出願中：特願平8-354786）である。モーターの時計回り・反時計回りの回転運動はリードス

図2 今回開発した培養細胞伸縮装置の斜視図³⁾。

クリューを介して往復運動に変換し、アームを左右に動かすことでシリコンベルトを伸縮させるのである。動力に使う高トルクステッピングモーターは、その名の通り力が強く、オリジナルの長さの倍以上の伸展も容易に可能にした。またこのモーターは上記したようにプリンターの印字ヘッドの位置決めに使われるほど精度が高く、任意の細かいステップで伸展率のコントロールを可能にした（例えば0～100%の伸展率を0.1%きざみで設定可能）。さらにモーターの制御に専用のコントロールドライバーを使うことで、加速度の設定や一時停止を含む伸縮スケジュールが容易にプログラム可能である。しかもシステム一式の価格は前述の市販の機械の約8分の1に抑えることができた。

本デバイスを用いた実験例（本デバイスを用いて初めて明らかになったこと）

今まで、培養細胞を伸展させる目的で作られたデバイスの伸展率は通常3%～5%、高いものでもせいぜい35%で、それ以上の伸展が可能な機械はなかった。生理学的な見地から考えればこの程度の伸展率で充分だったのかもしれないが、このほど初めて基質上の細胞を100%以上の伸展率で均等に变形させることのできる装置を作ったのである。当初は「基質が元の長さの倍ぐらいに引き伸ばされたら細胞がしがみついているわけないし、ちょっとオーバースペックかな」とも考えたが、実験をしてみても細胞の適応力に驚かされた。なんと細胞はオリジナルの倍以上の長さに引き伸ばされても、1ヘルツで1時間ぐらいならシリコンベルトにしがみつきの、そのような環境に対応するべく細胞骨格の再編成をしていたのである。以来、私は本研究の一側面を「カタストロフィーの細胞学」と認識して「細胞は普段絶対に遭遇しないような刺激にも対処するだけの能力を持っている」事を証したと自負している。さらに今まで「律動的伸縮刺激を受けた細胞のストレスファイバーはその伸展方向に対して直交する方向に配向する」と信じられてきたが^{6),7)}、このたび「ストレスファイバーは伸展方向に対して斜めに配向し（図3）、しかもその傾きは伸展率に依存して変化する³⁾」ことを明らかにしたのである。このような相関関係は広いレンジの伸展率で実験することによって初めて導くことができたのであり、本デバイスの登場によりこれまでの常識がくつがえされたものと言える。

現在検討中の課題とストラテジー（こんな事も新しいデバイスで可能になった）

現在、我々はストレスファイバーが律動的伸縮場で

図3 律動的伸縮刺激に反応した細胞内ストレスファイバーの典型的な配向パターン。伸展方向(矢印)に対して斜めの方向に並んでいる。

斜めに配向する現象には、伸展とそれに直交する方向の圧縮の両者が深く関わっていると考えている。ストレスファイバーの角度が伸展率にのみ依存する関数ではないことの証明は伸展率に対する圧縮率の比(すなわちポアソン比)を変える事で実行できるが、一般にある材料のポアソン比はそのものの物性として決まっているので変えるわけにはいかない。方法はないのか？実は本デバイスを使う事により一つの解決法が見つかった。すなわち「静止トルクも高い」という本モータ

ーの特性を生かして、伸展した状態のシリコンベルトの上に細胞を培養し、あとは同じプログラムで律動的伸縮刺激を行うのである(図1D→C)。これで見かけ上のポアソン比を変えることができる。現在このような実験も加えて、「何故ストレスファイバーは斜めに配向したのか」ということについて検討している。

文 献

- 1) K. Sugimoto, S. Fujii, and K. Yamashita, (1991) *Exp. Cell Res.* **196**, 353-361.
- 2) K. Sugimoto, et al. (1995) *Euro. J. Cell Biol.* **68**, 70-77.
- 3) T. Takemasa, K. Sugimoto, and K. Yamashita, (1997) *Exp. Cell Res.* **230**, 407-410., Erratum: (1997) *Exp. Cell Res.* **232**, 191.
- 4) J. A. Gilbert, et al. (1994) *J. Biomech.* **27**, 1169-1177.
- 5) 曾我部正博, 成瀬恵治 (1996) 組織培養 **22**, 413-417
- 6) V. P. Shirinsky, et al. (1989) *J. Cell Biol.* **109**, 331-339.
- 7) T. Iba, et al. (1991) *Circ. Shock* **35**, 193-198.

生物物理学者のためのWWWホームページ (6・前半)

京都大学化学研究所 木原大亮

リンク集と言えばツール、データベース、雑誌などへの多数のリンクがアルファベット順に登録されているを持つPedroによるもの

(BERIでのミラーサイト: http://www.beri.co.jp/Pedro/research_tools.html) が有名ですが、これは最近更新されていないのでつながらないリンクも目立ちます(内容は生物物理36(5), 246(1996)参照)。そこで、今回はその他のリンク集を紹介します。

1. BioCatalog (<http://www.ebi.ac.uk/biocat/biocat.html>)
 DBCAT (<http://www.infobiogen.fr/services/dbcat/>)

BioCatalogは、EMBLの支所であるEBIが作成している配列解析ツールのカタログで、500以上のツールがWWWサイト、またはFTPサイトとともに登録されています。DBCAT

は各種配列、構造、文献等のデータベース、380以上が登録されているリストです。どちらも新規に登録するフォームが用意されているので、新しくツール、データベースを作成した場合は広く利用してもらうために登録しておくのがよいでしょう。

2. ABIM Biological servers on the Web
 (<http://www-biol.univ-mrs.fr/english/biology.html>)

これはマルセイユ大学によるもので、データベースでは特に生物種別やタンパク質のファミリー等の個別のものへのリンクが充実しています。ツールでは、各種アラインメント、系統樹作成、PCRプライマー選択、ORF予測、立体構造解析ツールなど各種揃っています。

(77ページにつづく)