磁気アルキメデス効果による 3 次元組織構築 —細胞挙動の磁場解析による予測と実験データとの比較—

Three Dimensional Tissue Construction Using Magneto-Archimedes Effect

- Estimation of Cell Movements by Magnetic Simulation and Comparison with Experimental Results-

○ 秋山 佳丈 (農工大) 正 森島 圭祐 (農工大)

Yoshitake AKIYAMA, Tokyo Univ. Agri. Tech., yakiyama@cc.tuat.ac.jp
Keisuke MORISHIMA, Tokyo Univ. Agri. Tech.

Magneto-Archimedes effect enables label-free cellular manipulation by magnetic force. In the present study, we estimate cell movement using computer simulation and compare with experimental results obtained by image analysis. The magnetic susceptibility of Gd-DTPA was determined using NMR and the force applying on the cell was estimated by magnetic simulation. On the other hand, living cells suspended in culture medium including Gd-DTPA were applied to the magnetic field. As a result, the cells moved to lower area of magnetic flux density and formed an egg-shaped spheroid in the bottom center of the chamber. The estimated moving velocity with the simulation was almost in agreement with the actual one. The results show that the final shape of the aggregated cells can be estimated by the computer simulation.

Key Words: Tissue Engineering, Magneto-Archimedes effect, Cellular Assembly, Three Dimensional Tissue Construction

1 緒言

ヒトにおいて ES 細胞だけでなく iPS 細胞が樹立され、各細胞への分化技術が確立されつつあるのに伴い、ティッシュエンジニアリングの可能性が大きく広がっている。そして、その第一の目的は、機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器の代替品として、機能を持った組織や器官を生体外において構築することである。これまでに、ポリ乳酸等の生分解性ポリマーの足場に細胞を播種することで組織の再構築が行われてきているが、臨床応用が行われているのは、皮膚、骨、軟骨、膀胱などで、比較的単純な組織構造と生理機能を有しているもののみであり、また問題点として、足場内で代謝不良による細胞の壊死や分解物による炎症などが問題となっている[1]。

足場を用いない手法としては、東京女子医大の岡野らのグループによる細胞シート工学が挙げられる。細胞シート工学では、温度応答性ポリマーを用いることで細胞をシート状で回収するもので、角膜や心筋シートなどが開発され、臨床応用が進められている[2]。一方、生体外で 3 次元組織を構築するために、九州大の井藤ら[3]や Texas 大の Pasqualini ら[4]のグループは、それぞれ独自に細胞を磁性微粒子で標識する方法を開発し、生体外での磁場による 3 次元組織構築を行っており、各種形状の組織を報告しているが、最終的に磁性微粒子を細胞から取り除く方法が問題となる。また、単一細胞のマニピュレーション法としては、光ピンセット[5]や磁気ピンセット[6]が挙げられるが、大量の細胞を同時に操作には適していない。

そこで我々は、細胞を磁性粒子等で標識することなくアセンブリするために、磁気アルキメデス効果に着目した[7][8]。溶液中の粒子に作用する磁力 F_m は以下の式(1)で表される[9]。

$$F_m = \frac{(\chi_p - \chi_m)V}{2\mu_0} \nabla B^2 \quad (1)$$

ここで、 χ_p , χ_m : 細胞および培養液の磁化率, V : 粒子の体積, μ_0 : 真空の透磁率, B : 磁束密度。

従って、高い磁化率を持つ培養液中に細胞を置いた場合、細胞が受ける力 F_m の符号が反転し、磁場は斥力として働くこととなる。そのため細胞は反磁性体として振舞う。この現象は、磁気アルキメデス効果と呼ばれており、粒子分離技術や擬似無重力環境の創出に用いられている。これまでに、我々は強磁性体化合物として、MRI造影剤として人体への投与が認められているガドリニウム化合物 Gadopentetic acid (Gd-DTPA) に着目し、大量の細胞を同時に標識することなくハンドリング出来ることを確認した。さらに、本法によりスフェロイドを高速で形成することに成功した。本研究では、スフェロイド形成の様子を側面から観察し、有限要素法によって得られた解析結果と比較を行った。

2 実験および結果

2.1 実験装置概要

実験装置概要を Fig. 1 に示す。4つのネオジム磁石 ($10 \times 10 \times 10$ [mm]) を N 極と S 極が交互になるように配置し、中央が最も弱くなるような磁場勾配を作製した。その上にほぼ 10 mm 角のガラス製チャンバー (底厚み: 0.02 [mm]) を載せ、

Fig. 1 Schemes of the experimental setup for cell aggregation. (a) Top view. (b) Cross sectional view when $y = 0$.

Fig. 2 ^1H NMR spectra of H_2O , Medium, and Medium with 34.6 mM Gd-DTPA.

Table 1 Mass susceptibilities of medium and Gd-DTPA.

	Mass Susceptibility [cm^3/g] (in cgs)	Mass Susceptibility [m^3/kg] (in SI)
Medium	-7.25×10^{-7}	-9.12×10^{-9}
Gd-DTPA	4.64×10^{-5}	5.83×10^{-7}

C2C12細胞(Riken Cell Bank)を 2.0×10^4 cells/chamberとなるように播種し、その中の細胞の挙動を真横からズーム顕微鏡(VHX1000, Keyence)により観察した。また、培養液にはDMEMに10% FBSおよび抗生物質を添加したものを用い、さらに、終濃度が34.6 mMとなるようにGd-DTPAを添加した。

2.2 磁化率測定

水のプロトン(^1H)の核磁気共鳴シグナルのズレより、磁化率を算出した。

磁化率は、 ^1H シグナルのズレを用いて以下のように表される[10]。

$$\chi_i = \frac{3}{4\pi m} (\delta_o - \delta_i) + \chi_o \quad (2)$$

ここで、 χ_o, χ_i : サンプルおよび基準物質の質量磁化率、 m : 1 mL中のサンプル質量、 δ_o, δ_i : サンプルおよび基準物質に含まれる水の ^1H シグナル。

水、培地(DMEM + 10% FBS)および34.6 mM Gd-DTPA添加培地のそれぞれの ^1H スペクトルを、NMRスペクトロメーター(ECX300, 日本電子)により測定した。なお、測定には $\phi 5$ mmのサンプルチューブに $\phi 3$ mmのサンプルチューブを挿入した二重管を用い、外部に重クロロホルム(CDCl_3)を、内部にサンプルを注入した。そして、 CDCl_3 の重水素ロック機構を用いて装置の静磁場 B_0 を均一に保った。

得られた ^1H スペクトルを重ね合わせたものを、Fig. 2に示す。培地の水の ^1H シグナルは、NaClなど無機塩類の影響でわずかに高磁場側にシフトしていた。一方、Gd-DTPAを含むMediumの水の ^1H シグナルは、Gdイオンの影響により、大きく低磁場側にシフトし、さらにGdの緩和時間短縮効果により、ピークの高さが減少し大きくブロードしていた。これらのピークの値を基に、水の質量磁化率: -7.203×10^{-7} [cm^3/g] (in cgs unit)[11]を用いて求めた質量磁化率の値をTable 1に示す。

また磁化率には加法性が成り立つので、34.6 mM Gd-DTPA添加培地の体積磁化率は 4.35×10^{-7} (in SI unit)と算出される。ここで、細胞の磁化率 χ_p を培地と等しいとすると、体積磁化率の差 $\chi_p - \chi_m$ は -1.03×10^{-5} (in SI unit)となる。

2.3 磁場解析による細胞にかかる磁力の概算

4つのネオジム磁石のN極とS極を交互に配置した場合(Fig. 1)の磁場分布を、有限要素法解析ソフトウェア(COMSOL Multiphysics 3.5a)により求めた。断面および磁石表面より0.5 [mm]上の平面上の磁束密度の分布をFig. 3に示す。まず断面において、向きの異なる磁石同士が接触する面における磁束密度は1.5 [T]程度と非常に高いのに対し、4つの磁石の中心部における磁束密度は、ほぼ0 [T]であった。また $z = 0.5$ [mm]、すなわち磁石表面より0.7 [mm]上の面においても、0.7 [T]と比較的高い磁束密度であることが確認された。

次に、得られた結果を式(1)へ代入することで、各位置における細胞にかかる磁力を求めた。ただし、細胞を、直径20 [μm]の球とした。平面 $z = 1.0$ [mm]上の細胞にかかる磁力(xy成分)のベクトルと分布をFig. 4に示す。また、平面 $y = 0$ [mm]上の細胞にかかる磁力のベクトル(xy成分)と分布(xz成分)のベクトルの向きと分布をFig. 5に示す。まず、 $z = 1.0$ [mm]に

Fig. 3 Magnetic flux density distribution on the planes at (a) $x = 0$ and (b) $z = 0.5$ mm.

において、磁石周辺部では外へ向かう磁力が働いているが、中心付近では中心へ向かう磁力が働いていた。また、4つの磁石のそれぞれの中央付近には、ほとんど磁力が働いていなかった。特に、細胞が存在するエリア、すなわちチャンパー内 ($x: -5 \sim 5$ [mm], $y: -5 \sim 5$ [mm]) においては、中心向きの力が働いており、最大で1.7 [pN]程度であった。また、チャンパー底面付近では、 xy 方向と比べて十分大きな $+z$ 方向へ磁力が働いていた。従って、細胞は重力と釣り合う位置まで一旦浮上もしくは落下した後、徐々に中心に集まっていくことが予想される。

2.4 細胞の磁場による移動の計測

次に、Gd-DTPAを含む培養液へ懸濁した細胞を注いだチャンパーを、4つのネオジウム磁石の上に設置した。細胞の凝集していく様子をFig. 6に示す。解析結果から予想された通り、底面付近の細胞は、一旦浮上した後に中心に凝集し、卵型のスフェロイドを形成した。また、スフェロイドの左右に、扇形の細胞の存在しない領域が見られた(Fig. 6(d)).また、凝集開始約10分後のスフェロイドのサイズは、直径: 470 [μm], 高さ: 600 [μm]であった。また、20分後には直径: 510 [μm], 高さ: 690 [μm]となり、40分後とほぼ同様であった。

次に、底面からの距離が1.0 [mm], 中心からの距離が0.82 [mm]の特定細胞の挙動に関して、DIPPMotion PRO(Ditect)を用いて画像解析を行った(Fig. 7)。その結果、細胞はほぼ水平方向に移動し、その水平方向の平均移動速度は、3.4 [$\mu\text{m}/\text{s}$]であった。一方、磁場解析の結果によると、水平方向においては、細胞に1.2 [pN] の力がかかっていた。粒子にかかる力と終端速度は、以下のストークスの式により表される。

$$F = 6\pi\eta r v \quad (3)$$

Fig. 6 Sequential images of spheroid formation as viewed from the side during 40 min.

Fig. 4 Vector and contour plots of the magnetic force applied on the cells for the plane $z = 1.0$ [mm].

Fig. 5 Vector and contour plots of the magnetic force applied on the cells for the plane $x = 0$ [mm]

Fig. 7 Trajectory and moving distance of the cell at 1.0 mm high from the bottom.

ここで、 η : 培養液の粘度, r : 細胞の半径, v : 細胞の運動速度.

細胞は十分に小さいため瞬時に終端速度に達するとし、 η を水と同様の 8.9×10^{-4} [Pa s], 細胞の半径10 [μm]とすると、終端速度は7.2 [$\mu\text{m/s}$]となった。この結果は、実際の速度と比べて2倍程度速いが、培地の粘度は解析で使用した水の値よりも大きい、使用したネオジム磁石の残留磁束密度は理論値であり、実際の磁石ではそれより低下していることを考慮にいと、ほぼ一致していると考えられる。

今後、細胞の比重を測定することで、磁場解析の結果に重力の影響を加味した解析を行いたい。また、培養液の粘度および残留磁束密度を測定することで、実測値に解析結果を近づけられると考えられる。以上により、シミュレーションによって最終的な細胞の凝集形状が予想できると考えられる。

3 結論

本研究では、磁気アルキメデス効果による生体外3次元組織構築法の開発に向けて、磁場解析および実験による結果の比較をおこなった。まず、ガドリニウム化合物 (Gd-DTPA) の磁化率をNMRにより測定し、磁場解析の結果と合わせることで、細胞にかかる磁力を概算した。その結果、チャンパー内部の細胞に対しては中心へ向かう磁力が働いており、特にその中でも底面付近の細胞に対しては、+z方向へ大きな磁力が働いていた。この磁力により算出される細胞の水平方向移動速度は、実測値と比べて2倍程大きかったが、使用した磁石の磁力低下や培地の粘度が水よりやや高いことを考慮にいと、十分に一致していると考えられる。以上により、シミュレーションにより最終的な細胞凝集体の形状が、予想可能であることが示された。

謝 辞

本研究の一部は、文部科学省の科学研究費補助金 (No.20034017, No.21676002, No.21111503, No.21225007) および NEDO 産業技術研究助成事業、磁気健康科学研究振興財団、カシオ科学振興財団による助成を受けて行われた。

文 献

- [1] 大和雅之 (2009), 組織工学, 浅島誠ら編, 再生医療生物学, pp. 113-137, 岩波書店
- [2] T. Okano et al, "Mechanism of cell detachment from temperature-modulated, hydrophilic-hydrophobic polymer surfaces." *Biomaterials*, 16, 297-303, 1995.
- [3] A. Ito et al, "Novel Methodology for Fabrication of Tissue-Engineered Tubular Constructs Using Magnetite Nanoparticles and Magnetic Force," *Tissue Engineering*, 11, 1553-1561, 2005.
- [4] G. Souza et al., "Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation," *Nature Nanotech.*, 5, 291-296, 2010.
- [5] H. Zhang and K. Liu, "Optical tweezers for single cells," *J. R. Soc. Interface.*, 5, pp. 671-690, 2008.
- [6] A. Winkleman, K.L. Gudiksen, D. Ryan, G.M. Whitesides, D. Greenfield, and M. Prentiss, "A magnetic trap for living cells suspended in a paramagnetic buffer," *Appl. Phys. Lett.*, 85, pp. 2411-2413, 2004.
- [7] 秋山佳丈, 森島圭祐, "反磁性細胞マニピュレーションによる非標識での超高速スフェロイド形成." 第28回日本ロボット学会学術講演会, 1M3-2, 2010.
- [8] Y. Akiyama and K. Morishima, "Label-free ultrarapid spheroid formation using magneto-Archimedes effect." *Appl. Phys. Lett.*, Submitted.
- [9] Q. Ramadan et al., "Customized trapping of magnetic particles." *Microfluid. Nanofluid.*, 6, pp. 53-62, 2009.
- [10] S. Berger and S. Braun, 200 and More NMR Experiments p. 305-307 (2004).
- [11] CRC Handbook of Chemistry and Physics, edited by D. R. Lide (CRC, Boca Raton, FL, 1993), p. 9.
- [12] P. Kuchel et al., "Magnetic susceptibility: Solutions, emulsions, and cells," *Concepts Magn. Reson. A*, 18, pp. 56-71, 2003.