

令和 2 年度 防衛装備庁
安全保障技術研究推進制度

研究成果報告書

メカニカルストレス負荷システムの開発

令和 3 年 5 月

岡山大学

本報告書は、防衛装備庁の安全保障技術研究推進制度による委託業務として、国立大学法人岡山大学が実施した令和2年度「メカニカルストレス負荷システムの開発」の成果を
取りまとめたものです。

0. 研究背景

我々のからだは常に外界からせん断応力、伸展圧縮等の物理的刺激を受け適切に反応している。物理的刺激の一つである静水圧について今回我々は着目した。水深4000 m付近では約40MPaの高静水圧がかかり、ヒトの細胞の崩壊を誘引することが知られている。また、100 MPaを超える静水圧には、殺菌作用があることは長らく認知され、それ以下の数十MPaの圧力では細胞・組織が活性化するという知見があった。生体内では数十MPaの静水圧は歯周組織・膝関節軟骨などに実際に負荷されており決して非生理的ではない。実際、歯根と歯槽骨をつなぐ歯周組織である歯根膜組織では、咀嚼時に数十MPaの咬合圧が負荷される。これらの機械刺激は、破骨細胞の活性化等を惹起し歯周組織のリモデリングに繋がる。また、軟骨細胞においても、歩行時に数MPa、激しい運動時には数十MPaの圧力が膝に負荷されることが報告されている。しかしながら、歯周組織や軟骨組織での細胞レベル、分子レベルでの圧力負荷応答メカニズムの詳細は未だ分かっていない。その大きな理由は、高圧力下での細胞応答の計測が困難であることによるものである。

1. 委託業務の目的

(1) 研究課題の最終目標

本研究はセンシングデバイス自体の開発ではなく、その受け手側である生体のメカノセンシング機構解明を目指したチャレンジングな取組みである。この未踏である生体メカノセンシング機構の一端が解明されれば、センシングデバイス構築に新たな第一歩となる可能性がある。

本研究計画では、静水圧刺激による細胞内情報伝達メカニズムを解明することを目的としたシステムを開発する。このため、3年間の業務において、高静水圧下でのヒト歯根膜細胞及び軟骨細胞をリアルタイムに観察可能な顕微鏡の構築、並びに高静水圧条件下でのシグナル伝達機構の解明に向けた高圧長期培養装置を開発する。具体的には以下に示す。

1. 静水圧 5 MPa 単位で 0.1 MPa(大気圧)から 50 MPa まで任意の波形でコントロールできるシステムの開発
2. 細胞内シグナル伝達機構の可視化が可能な蛍光観察システムの開発
3. 1週間以上の長期間での細胞における高圧力の影響を調べるシステムの開発

(2) 最終目標を実現するために克服又は解明すべき要素課題

(1) で示した最終目標を実現するために克服すべき要素課題は以下のとおりである。

① 高圧下での細胞の動態計測実施のための高圧可変システムの実現

咀嚼や歩行には多様性が存在し、細胞には様々な圧力パターンが加わることから、本研究ではそれを再現する必要があるが、本研究で必要な圧力域や圧力パターンの再現が可能な圧力可変システムは現時点で存在しない。また多くの実験では、加圧中の細胞動態を詳細に解析することは困難で、一般的に使用される細胞免疫染色法では、加圧後、減圧してからの細胞状態しか計測できない。様々な高圧条件下での“生きた細胞”の圧力受容応答の観察手段が必要である。

② 高圧下での長期細胞培養と細胞の動態の計測

遺伝子の発現系や細胞機能の表現の違いを観察するには、1週間程度の時間スケールでの実験が必要とされる。一般的な細胞培養には、5% CO₂ かつインキュベータ内での培養が必要であるが、高圧状態を維持しながらの高圧チャンバー内のガス交換は技術的に困難である。

(3) 要素課題に対する攻略手段と実施項目及びそのための体制

バイオセンサー、マイクロマシンの専門研究協力者と、テレビ電話等を用いた月1回程度のディスカッションを行い、センシングデバイスの構築に向けての知見を得る。

① 高圧顕微鏡システムの開発

多目的用の市販の装置があるが、細胞内情報伝達系測定のためには高圧チャンバーとその周囲環境を制御するシステムの最適化（時間・温度・圧負荷のタイムコースなどの測定が可能になる測定システム設計）を実施する必要がある。具体的には以下の数値目標を設定する

- (a) 高解像の細胞観察を実現するため、高開口数の対物レンズ(開口数 0.7 以上)の使用可能な高圧チャンバーを開発する。2019 年度以降は光学窓材質にサファイア等を使用し、耐圧性能を維持しながら単一分子観察が可能なサイズを模索する。
- (b) 多くの細胞内情報伝達機構には、カルシウムの細胞内変化が関わっていることが知られている。そこで、カルシウム濃度変化の蛍光可視化が可能な高圧顕微鏡システムの実現を目的とする。この技術は高開口数の対物レンズに大きく依存するため、前述の高圧チャンバーが実現できればよい。

② 高圧長期培養装置の開発

高圧力下での 1 週間程度の細胞培養には、一般的に細胞培養に使用されるインキュベーター内での培養が必要である。具体的には以下の目標を設定する

- (a) 細胞培養のためのガス交換可能な高圧チャンバーシステムの開発を実施する。
- (b) 高圧下での長期培養した細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する。遺伝子の網羅的解析は比較的確立された技術であるマイクロアレイ、RNA-seq 等を用いて高圧力に感受する遺伝子の探索を実施する。

2. 研究開始時に設定した研究目標の達成度

(1) 高圧顕微鏡システムの開発

(研究開始時の設定目標)

細胞内情報伝達系測定のために、高圧チャンバーとその周囲環境を制御するシステムの最適化（時間・温度・圧負荷のタイムコースなどの測定が可能になる測定システム設計）を実施する。

- (a) 高解像の細胞観察の実現のため(単一分子観察)、高開口数の対物レンズの使用可能な高圧チャンバーを開発する。
- (b) 多くの細胞内情報伝達機構には、細胞内のカルシウム濃度変化が関わっていることが知られている。そこで、カルシウム濃度変化の蛍光可視化が可能な高圧顕微鏡システムの実現を目標とする。この技術は高開口数の対物レンズに大きく依存するため、前述の高圧チャンバーが実現できればよい。

(研究開発の達成度)

PC 制御による高静水圧負荷システムの開発に成功した(図 1)。この結果、静水圧の 0.1-50 MPa まで任意の波形での負荷が可能となった。また、残念ながら単一分子観察が可能な高圧チャンバーの完成には至らなかったが、従来(N.A.=0.6)よりも高開口数を有する対物レンズの(N.A.=1.0)の使用が可能なシステムの構築に成功した。さらに、従来の高圧チャンバー底部の光学窓の厚さを薄くした、高圧チャンバーに装着可能な光学キュベットを作製し、更なる高解像度計測の可能性を見出した(図 2)。また、高静水圧刺激による細胞内のカルシウム濃度の変化は観察されなかった。

(2) 高圧長期培養装置の開発

(研究開始時の設定目標)

高圧力下での 1 週間程度の細胞培養には、一般的に細胞培養に使用されるインキュベーター内での培養が必要である。具体的には以下の目標を設定する。

- (a) 細胞培養のためのガス交換可能な高圧チャンバーシステムの開発を実施する。

(b)高圧下での長期培養した細胞の遺伝子発現を網羅的に解析する。遺伝子の網羅的解析は比較的確立された技術であるマイクロアレイ、RNA-seq 等を用いて高圧力に感受する遺伝子の探索を実施する。

(研究開発の達成度)

当初の目標通り、高圧を維持し、長期間の細胞培養が可能な長期培養装置を開発した(図 3)。またこの容器を用いて、高静水压刺激による細胞の遺伝子発現のマイクロアレイによる網羅的解析を実施した。

3. 委託業務における研究の方法及び成果

1. 高圧顕微鏡システムの開発

1.1 高圧負荷システムの開発

静水压刺激を制御するシステム開発において、直動ステッピングモーターによる高静水压力制御を実施した。デジタル圧力計からの信号を Bluetooth にて取り出し直動ステッピングモーターにフィードバックをかけることにより任意の高静水压を負荷するシステムを開発した(図 1a)。開発の過程でステッピングモーターにてボールねじを回しピストンを移動させる方式では 50MPa が達成できた。波形制御のためには高速化が求められるので直動式ステッピングモーター系に変更した。現行モーターでは約 40MPa でバックスラッシュが発生し限界と考えられた(図 1b)。軟骨細胞・歯根膜細胞を用いた実験では 30MPa で十分であり、実用的に問題はなかった。図 1c にコマンドパルスとその実測値を示す。

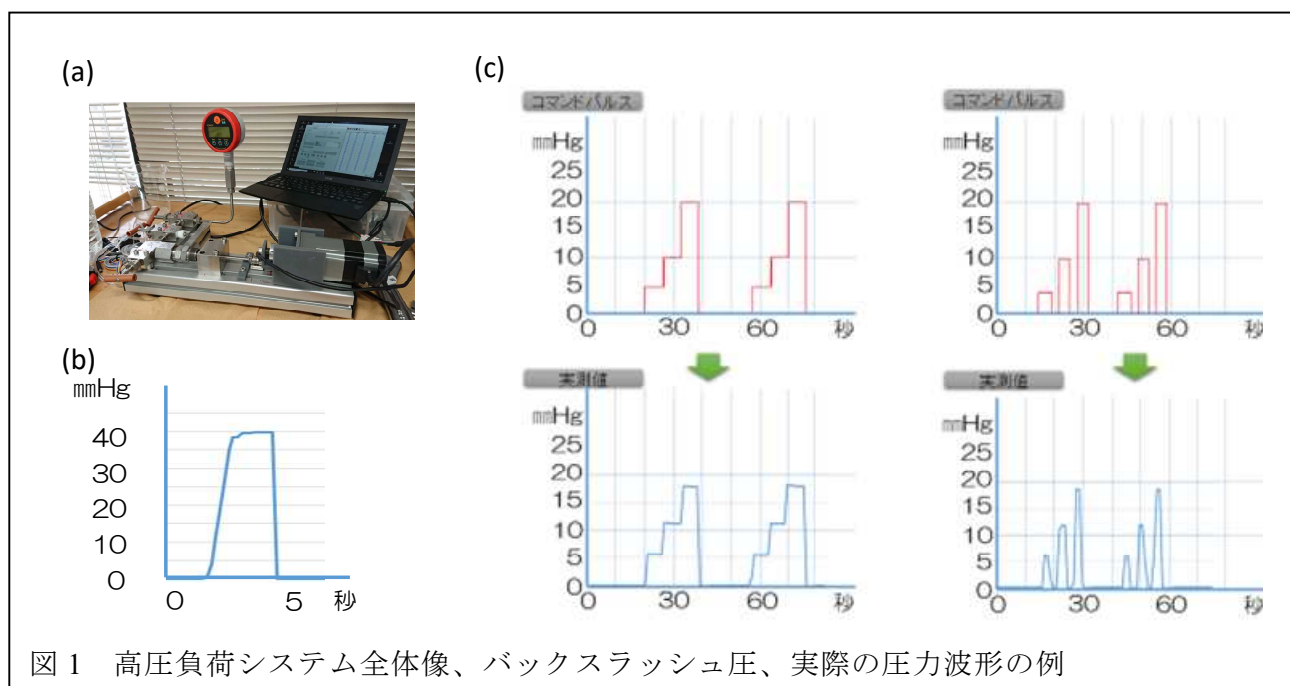


図 1 高圧負荷システム全体像、バックスラッシュ圧、実際の圧力波形の例

1.2 高圧チャンバーの開発

細胞内情報伝達シグナルの可視化のため、高静水压下での蛍光観察システムの構築を実施してきた(図 2a)。残念ながら単一分子観察が可能な高圧チャンバーの完成には至らなかったが、従来(N.A.=0.6)よりも高開口数を有する対物レンズの(N.A.=1.0)の使用が可能なシステムの構築に成功した。また、更なる高解像度観察を目的に、従来の高圧チャンバー底部の光学窓の厚さ(1.5 mm)に比べ、約半分(0.75 mm)にまで薄くした。高圧チャンバーに装着可能な光学キュベットを構築した(図 2b)。光学キュベットの屈折率は 1.52 であり、高開口数対物レンズと光学キュベット間にシリコンオイル(屈折率 1.4)あるいはイマージョンオイル(屈折率 1.52)を充填した光学系を構築した。残念ながら、耐圧性能の向上のため観察面積が 0.5 mm となり、使用性に問題が生じた。観察面積が小さいため、多くの細胞動態計測に向かない上に、事前に多くの

キュベットの用意が必要となることが問題となる。今後の課題としては、光学窓の厚さを更に薄くする(~0.17 mm 程度)点と使用性の向上を目指したキュベットの開発が必要と考える。

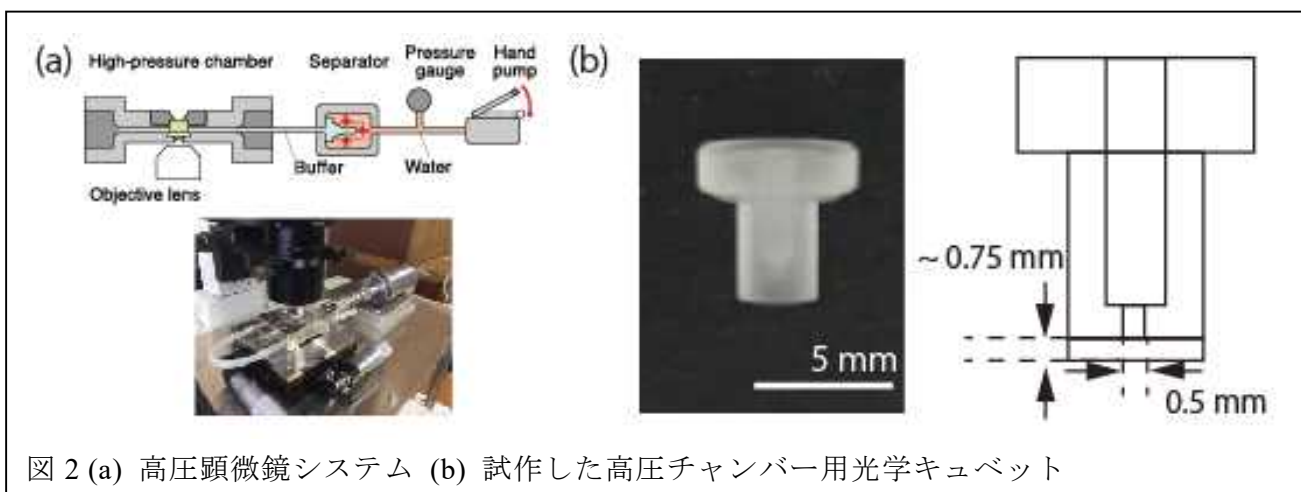


図 2 (a) 高圧顕微鏡システム (b) 試作した高圧チャンバー用光学キュベット

2. 高圧長期培養装置の開発

細胞培養のためのガス交換可能な高圧チャンバーシステムの開発した。本システムでは、設定した圧力以上で、培養装置内の溶液が灌流可能な状況となっており、インキュベーター内で細胞の培地が常に循環される形となり 1 週間ほどの長期培養が可能となった(図 3a)。また、この培養装置に定圧、周期的圧力を自動的に負荷するための電動ポンプシステムの構築に成功している(図 3b)。本機器において圧力計での目視による最大圧力 50 MPa、約 10 秒に一回程度の周期的圧力の出力を確認した。また、この装置培養した細胞の遺伝子の網羅的解析を実施した。

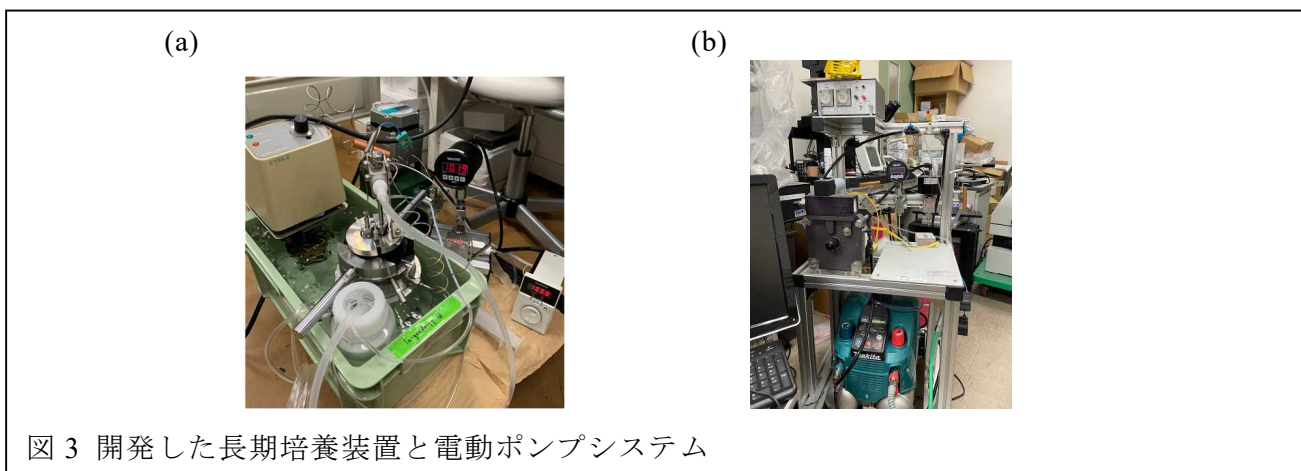


図 3 開発した長期培養装置と電動ポンプシステム

4. 委託業務全体の成果

4. 1 計画時に想定していなかった成果（副次的成果）や、目標を超える成果

研究対象である歯根膜細胞、軟骨細胞は共に日常生活において生体内で常に圧力刺激に曝されている。しかしながら、圧力刺激による遺伝子発現量の変化は異なる。さらに軟骨組織においても、軟骨肉腫由来か正常組織由来かによっても、圧力刺激による遺伝子発現変動のパターンが異なることが分かった。この成果は本計測システムを構築によってもたらされた予想外な結果であり、今後もこれらのメカニズムの解明が臨床技術への新たな知見創出に寄与するものとする。

4. 2 研究課題の発展性（間接的成果を含む）

高静水圧による細胞機能メカニズムの更なる解明には、やはり高解像度での分子の局在を観察するシステムが必須となる。光学窓の厚さの問題により、開発したシステムでは未だ、開口数が1.0程度の対物レンズしか使用できないため、更なる高開口数(~1.4)を使用するにはさらに薄い光学窓が必要となる(~0.15 mm)。しかしながら、耐高圧性を維持するには、構造的に非常に難しく、仮に作製したとしても、使用性が低いことが本研究プロジェクトの結果から容易に推察される。しかしながら、現在の解像度でも細胞骨格、細胞質、細胞核などの蛍光観察は可能であることから本計測システムを用いた更なるメカニズムの解明に繋がることが期待される。

4. 3 研究成果の発表・発信に関する活動

学会会議や講演会での本研究事業での成果を発信した。さらに現在、本プロジェクトで得た研究成果の学術論文への投稿を準備している。

5. プロジェクトの総合的推進

5. 1 研究実施体制とマネジメント

プロジェクト全体の進捗状況を確認しつつ計画の合理化を検討し、必要に応じて調査或いは外部有識者を招聘して意見を聞くなど、プロジェクトの推進に活かした。

5. 2 経費の効率的執行

当初予定していた、人件費からの本研究推進を加速するために、自動の高圧負荷装置の導入に経費を転用した。また、コロナ禍による学会発表旅費等を細胞内情報伝達経路の解明に向けた試薬の購入に転用した。

6. まとめ、今後の予定

本研究計画では、物理的刺激の一つである静水圧について今回我々は着目し、静水圧刺激による細胞内情報伝達メカニズムを解明することを目的としたシステムの開発を実施した。その結果、1.静水圧5 MPa単位で0.1 MPa(大気圧)から50 MPaまで任意の波形でコントロールできるシステム、2.細胞内シグナル伝達機構の可視化が可能な蛍光観察システム、3.1週間以上の長期間での細胞における高圧力の影響を調べるシステム、の開発に成功した。さらに開発したシステムを用いて、静水圧刺激による細胞内情報伝達メカニズムのモデル提案が可能となった。今後は、高解像度での分子局在を観察するシステムへ開発の推進と同時に、更なる静水圧刺激による細胞内情報伝達メカニズムの解明に努めたい。

7. 研究発表、知的財産権等の状況

(1) 研究発表等の状況

種別	件数
学術論文	0
学会発表	2
展示・講演	2
雑誌・図書	0
プレス	0
その他	0

(2) 知的財産権等の状況

該当なし

(3) その他特記事項

該当なし