

細胞伸展装置の製作

小林 浩三^a、山城 義人^b

^a 筑波大学医学医療系技術室、^b 筑波大学生存ダイナミクス研究センター

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

概要

血管を構成する細胞は、心臓の拍動・血管内圧に起因する伸展張力を受けている。伸展張力応答のメカニズムを理解し、血管病態発症の根本原因を明らかにすることが重要である。この目的のための血管平滑筋細胞の伸展刺激応答の解析を行う装置は市販されているものが高額であり、簡単には導入できない。そこで、伸展動作を単機能化し、安価に装置を製作した。その装置を使用して血管平滑筋細胞の伸展刺激応答の解析を行った結果、伸展刺激下における細胞外マトリックスの役割と血管病態発症の関わりを明らかにしたので報告する。

キーワード：血管平滑筋細胞、伸展装置

1. はじめに

細胞伸展装置は、シリコン樹脂製の培養容器で細胞を培養し、培養容器の伸展を繰り返し行う。同時に実験できる培養容器の数、周期、伸展率、使用環境などの仕様をもとに、筑波大学医学工務室が、生命科学分野の研究・教育に使用される実験装置、機器の製作を長年にわたり手がけてきたノウハウを生かし、装置製作を実施した。

2. 設定した装置の仕様

市販の装置は、カタログ上でのスペックを見ると多機能であることがわかる。反面、高額である。そこで、機能を極力削減し、低価格な装置の実現を目指し、仕様を表1のように設定した。

表1 設定した装置の仕様

培養容器装着個数	6個
伸展率	5%、10%、20%
周期	1Hz
連続運転時間	24時間
異物混入防止対策	アクリル樹脂製カバー

3. デザインおよび部品の構想

仕様をもとにデザインのもととなる構想を進めた。装置が仕様を満たし機能するための機構を決定する。仕様以外で求められたのが低価格である。その方針を念頭において作業を進めた。

3.1 機構の決定

仕様を満たすための機構としてサーボモーター等を用いた電子制御式にすると高額になるので採用することは難しい。そこで、機械式の単純なクランク機構を用いることにした。伸展率を変更するにはモーターの回転軸との偏心量を変えることで実現できるので、その偏心量の違う部品(偏心軸)を必要数用意すればよい。

クランク機構の欠点は、偏心軸の回転による水平軸の移動の加速度が一定とならない。しかし、今回の装置では目的に影響がないことを確認の上、採用するに至った(図1)。

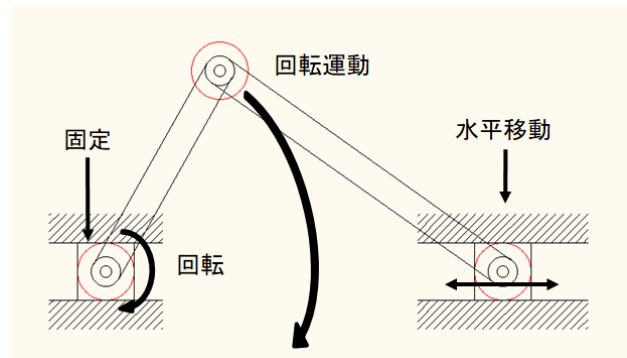


図1 クランク機構

3.2 購入部品の選定

機構の決定に伴い、構成する部品を購入または製作することになる。そこで、方針に従い購入する部品の選定を最初に行った。

3.2.1 スライドガイド

市販のシリコン製の培養容器を伸展させるため片側を固定して、もう一方の側を牽引する。培養容器には四隅に穴が開いている(図2)。この穴にピンを差し込むことを想定している。そこで、培養容器に差し込んだピンを直線上に牽引するためにスライドガイドを採用することは、自動的に決まった。スライドガイドとは、そういった直線運動を正確に行うための部品である(図3)。

培養容器6個を同時に伸展させるには横に並べるデザインが最もよいと判断した。したがって、スライドガイドは培養容器6個分よりも幅が広いものが要求されたが、現実的ではなかった。そこで、市販

^a kkouzou@md.tsukuba.ac.jp

^b yamayoshito@tara.tsukuba.ac.jp

されている中で最も適切と考えられたスライドガイドを2列並べるデザインを採用した。

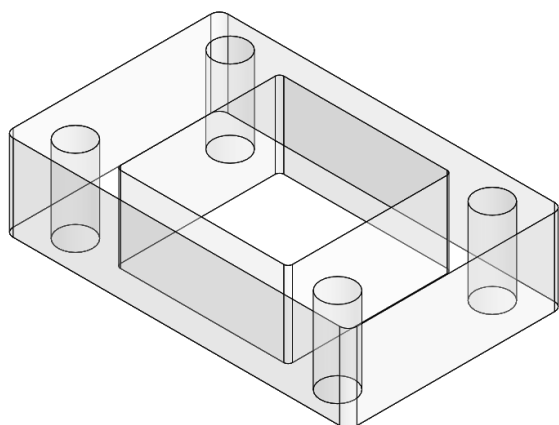


図2 シリコン製培養容器

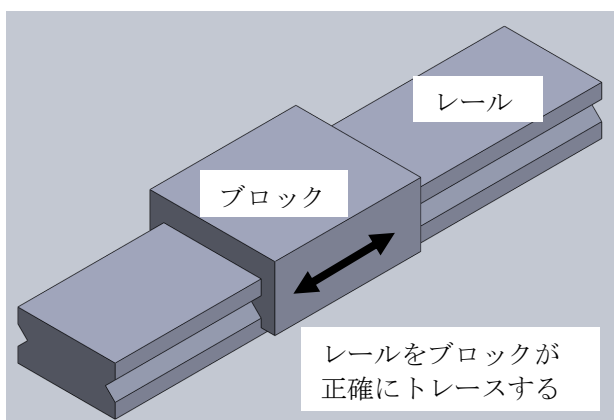


図3 スライドガイド

3.2.2 ロッドエンドベアリングとユニバーサルジョイント

スライドガイドは水平に直線運動する。一方、クランク機構では偏心軸によりスライドガイドに運動を伝えるシャフトは角度が変化する。そこで、ロッドエンドベアリングとユニバーサルジョイントを組み合わせることで、角度の変化を吸収することに成功した(図4)。

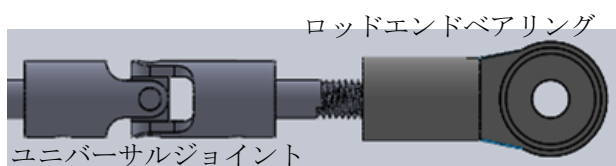


図4 角度の変化を吸収する仕組み

3.2.3 ドライブシャフト

ドライブシャフトはモーターに取り付けたロッドエンドベアリング側とスライドガイド側にそれぞれ

あり、偏心軸とスライドガイドの距離を調節する役目を持っている。距離を調節できることで培養容器をどの位置から牽引するか位置合わせをすることが可能となる(図5)。

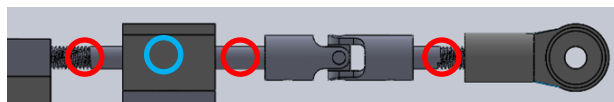


図5 ドライブシャフト(赤丸)と
リニアブッシュハウジングユニット(青丸)

3.2.4 リニアブッシュハウジングユニット

偏心軸とスライドガイドは上記各部品によって連結された。しかし、そのふたつの部品間の距離が長く、不安定であった。そこで、スライドガイド側のドライブシャフトをリニアブッシュハウジングユニットで支持し、安定させることにした(図5)。

3.2.5 ピン

培養容器に差し込むためのピンは、全部で24本必要となる。適当なものを探したところ、要求された太さ、長さのものが部品として安価に販売されていたことから購入品に分類した。

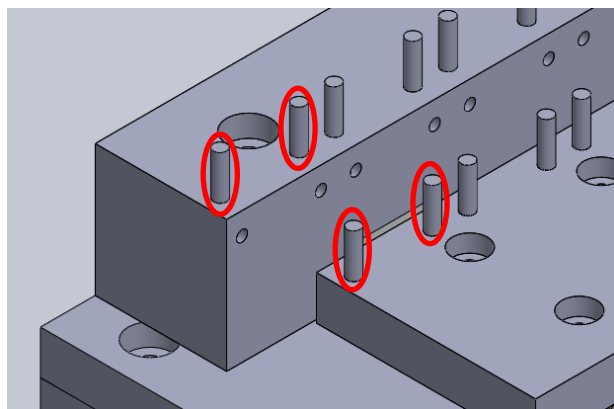


図6 ピン(4本で培養容器1個分)

3.3 医学工作室で製作する部品

医学工作室では開設当初から錆びにくい材質の材料を使用することを求められた。金属では真鍮・アルミ、樹脂ではアクリルが多かったので、それらの加工に慣れている。

本装置では、全体のベースとなる板をはじめ、製作する部品のほとんどはアルミ板で、一部でアクリル板を使用することを前提とした。

さらにアルミ材料は、穴あけ、ねじ切り加工だけで済むように心がけた。

4. 装置のデザイン

機構が決定し、デザインや部品の構想が整ったところで、実際に装置をデザインした。

4.1 3DCAD

デザインには、3DCAD ソフトの SolidWorks を用いた。SolidWorks は 3DCAD ソフトの中では、ミッドレンジに位置付けられる。更に本格的な商用ソフトには劣るものの医学工作室での使用に十分なソフトウェアである。

ここでは、モーター以外のデザインを完了させる。

4.1.1 部品の 3DCAD 図

現在では、部品の 3DCAD 図がメーカーサイトや部品専用のサイトから多くダウンロードできるようになっている。それらを活用し、デザイン時間の短縮を心がけた。

4.1.2 デザインの 3DPDF 化

SolidWorks にはソフトウェアを持たないユーザーとデザインを共有するためのツールとして eDrawings が装備されている。これを使用する方法もあるが、コンピューターの環境に依存されるので誰とでもデザインを共有することはできない。そこで、デザインを共有するツールとして Acrobat の 3DPDF ファイルを活用した。3DPDF ファイルも一部で表示できないとの報告もあるが、ごくごく希なことである。今回も活用することで問題なくデザインを共有することができた(図 7)。

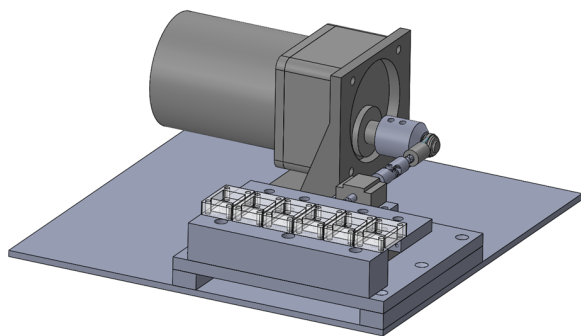


図 7 デザインを 3DPDF 化

5. 負荷の測定とモーターの選定

モーターの選定は、モーターメーカーの選定サービスを利用した。選定してもらうための条件として、最低でも、機構と負荷が必要となる。

ここまでで、すでにモーターを除くデザインが完了している。(実際はモーターの選定にあたって仮のモーターもデザイン上で存在している。)

本装置での負荷は主に培養容器を牽引する力となり、装置自体の摩擦抵抗等はほぼ無視できるレベルである。負荷の測定は、バネばかりを使用した。培

養容器の穴に 2 本のピンを差し込んでバイスに固定し、もう一方の穴に差し込んだピンは板に固定してその板をバネばかりに引っ掛けて牽引し力を測定した。

デザインと負荷の測定結果をもとにメーカーにモーターを選定してもらった。今回は、選定結果に「実機での確認が必要」と追記があったので、採用したモーターはメーカーに選定してもらったものよりも大きいものであった。

6. 装置の製作

6.1 材料・部品の調達

アルミ材料は、専門の材料販売会社から購入した。前述したようにアルミ材料は必要最低限の加工にとどめることにしていたので、材料を購入する段階ですでに前処理が完了していることが望ましい。そこで、指定のサイズで購入する際にそのサイズの寸法精度が要求する誤差の範囲内に収まっていることが重要である。購入先の材料販売会社は、そのような材料の切断方法を備えていてかつ安価に提供してもらえる。

部品は、頻繁に取引のある機工商社から購入した。ある程度の部品については、インターネット上で探し、仕様や部品図を入手可能であるが、それが難しいときに機工商社に依頼すると目的の部品を探してもらえる。今回もいくつかの部品は探してもらった。

6.2 部品の加工

部品の加工は、全て医学工作室で実施した。室内での加工は、図面上で特に指定のない限り、要求する寸法精度で部品が仕上がることが、これまでの実績から明らかなので安心である。

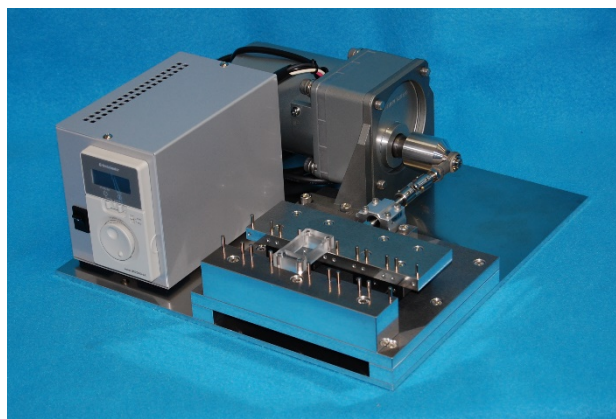


図 8 完成した装置

6.3 組立・調整

組立は、定盤の上で M ブロックを用いながら平行や直角になるよう行った。その結果、各部品の位置のずれなどからくる抵抗がない、スムーズな動きが実現できた。(図 8)

ドライブシャフトは、組み込みの際に培養容器をどの位置から牽引するか的位置合わせをする機能を

持っている。しかし、メモリなどがなく、正確な位置合わせができないので、位置決めのための調整用ブロックを製作した。このブロックを用いてモーターが回転しスライドガイドが往復運動するときの停止する位置、すなわち死点の位置を決めることで、偏心軸を交換したときでも同じ場所を死点とすることが可能となった。

6.4 試運転

完成後に試運転を実施した。仕様では連続運転が24時間ということであったが30時間くらいの試運転を実施した。それでもモーターの発熱、機構部品からの異音などの異常は全く見られなかった。

7. 成果

研究グループは、血管平滑筋細胞において、周期的な伸展刺激によって細胞外マトリクス Thrombospondin-1 (Thbs1) の発現が誘導されることを明らかにし(図9、10)、大動脈瘤の形成に重要な

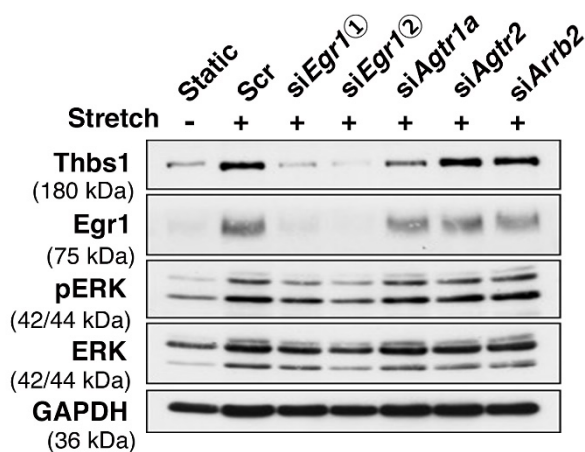


図9 伸展刺激による Thbs1 の発現

働きを担う知見を2018年8月9日付 *Circulation Research* 誌で報告した^[1]。また、伸展刺激中の細胞上清を回収し、伸展刺激によって分泌される細胞外マトリクス85種を同定した。さらに、伸展刺激によって分泌される Thbs1 が細胞接着斑のインテグリンに結合し、細胞内のメカニカルストレス応答因子 Yes-Associated Protein (YAP) の核内移行を制御している知見を報告した^[2]。

これらの成果は、血管病態の根本的な病因となる細胞内シグナル伝達の分子メカニズムを明らかにするものであり、本装置が果たした貢献度は高い。

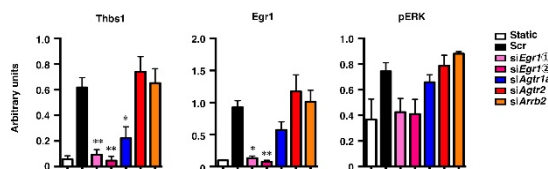


図10 伸展刺激による Thbs1 の発現(定量)

謝辞

本装置製作にあたり、部品加工にご協力いただいた筑波大学医学医療系工作室、沼尻久技術専門職員に感謝する。

参考文献

- [1] Yamashiro Y, Thang BQ, Shin SJ, Lino CA, Nakamura T, Kim J, Sugiyama K, Tokunaga C, Sakamoto H, Osaka M, Davis EC, Wagenseil JE, Hiramatsu Y and Yanagisawa H, Role of thrombospondin-1 in mechanotransduction and development of thoracic aortic aneurysm in mouse and humans, *Circ. Res.* 123(6) (2018) 660-672.
- [2] Yamashiro Y, Thang BQ, Ramirez K, Shin SJ, Kohata T, Ohata S, Nguyen TAV, Ohtsuki S, Nagayama K and Yanagisawa H, Matrix mechanotransduction mediated by thrombospondin-1/integrin/YAP signaling pathway in the remodeling of blood vessels, *BioRxiv* (2020) <https://doi.org/10.1101/814533>

¹ 筑波大学・プレリリース <http://www.tsukuba.ac.jp/wp-content/uploads/180810yanagisawa-3.pdf>

Production of cell stretching device

Kozo Kobayashi^{a)}, Yoshito Yamashiro^{b)}

^{a)} Technical Service Office for Medical Sciences, University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

^{b)} Life Science Center for Survival Dynamics, Tsukuba Advanced Research Alliance (TARA), University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8577 Japan

The cells that comprise the blood vessels receive tensile-stretch tension due to cardiac pulsation and intravascular pressure. Understanding the physiological response to this may clarify the fundamental role in the vascular pathogenesis. A device for analyzing the stretch stimulus response of vascular smooth muscle cells (VSMCs) for this purpose is commercially available but expensive and complex. Therefore, the extension operation was condensed into a single function and an apparatus was manufactured at low cost. Using this device, we revealed the extracellular matrix protein, Thrombospondin-1 plays crucial role in response to cyclic stretch and involved in vascular pathogenesis.

Keywords: Vascular smooth muscle cells, Extension apparatus