

博士論文 (要約)

骨格筋アクチュエータの立体的構築

森本 雄矢

目次

第 1 章	序論	4
	1.1 本研究の目的と意義	4
	1.2 研究の背景及び従来研究	7
	1.2.1 次元骨格筋線維束の構築方法	7
	1.2.2 骨格筋線維の配向性制御	11
	1.2.3 筋肉を駆動源とするバイオアクチュエータ	12
	1.2.4 骨格筋線維束の薬物動態モデルへの応用	14
	1.3 本研究で提案する骨格筋線維束とその応用	15
	1.3.1 骨格筋線維束の構築法	15
	1.3.2 拮抗筋を有する骨格筋アクチュエータ	18
	1.4 本論文の構成	19
第 2 章	骨格筋線維束の設計	20
	2.1 緒言	20
	2.2 骨格筋線維束の駆動モデル	20
	2.2.1 骨格筋線維束収縮力モデル	20
	2.2.2 収縮による変位がない条件での収縮力モデルの適用	22
	2.2.3 収縮による変位がある条件での収縮力モデルの適用	22
	2.2.4 弾性基板の変形モデル	22
	2.3 骨格筋線維束の作製方法	24
	2.3.1 筋芽細胞含有ゲル構造のパターニング	25
	2.3.2 筋芽細胞含有ゲルシートの積層	26
	2.3.3 固定部材付き柔軟電極基板の構築	28
	2.4 結言	29
第 3 章	骨格筋線維束の構築と特性評価	30
	3.1 緒言	30
	3.2 骨格筋線維束の特性とゲル構造寸法との関係	30
	3.2.1 骨格筋線維束の形状と構造	30
	3.2.2 骨格筋線維の長さ	34
	3.2.3 骨格筋線維の成熟度	35
	3.2.4 骨格筋線維束の配向性	38
	3.2.5 骨格筋線維束の収縮力	41
	3.2.6 収縮力モデルとの比較	44
	3.3 ゲルシート積層により作製された骨格筋線維束の特性	44
	3.3.1 ゲルシート積層による骨格筋線維束の構築	44
	3.3.2 シート積層により作製した骨格筋線維束の収縮特性	49
	3.4 柔軟電極基板上での骨格筋線維束の収縮特性	49
	3.4.1 柔軟電極基板上での骨格筋線維束の構築	49

3.4.2	柔軟電極基板上での骨格筋線維束の収縮特性.....	51
3.4.3	腱様構造を有する骨格筋アクチュエータの駆動特性	55
3.5	結言	56
第 4 章	骨格筋線維束の応用検討	58
4.1	緒言	58
4.2	単一骨格筋線維束を用いた応用検討	58
4.2.1	神経-筋肉組織の構築.....	58
4.2.2	神経-筋肉組織における神経筋接合部の評価.....	61
4.2.3	神経刺激による骨格筋線維束の収縮特性.....	63
4.2.4	骨格筋線維束のコラーゲン構造への包埋.....	67
4.2.5	空気中におけるアクチュエータの駆動特性.....	68
4.2.6	アクチュエータによる空気中での仕事.....	70
4.3	拮抗筋構造を用いた応用検討	70
4.3.1	拮抗筋構造の構築.....	70
4.3.2	骨格筋線維束の選択的駆動.....	73
4.3.3	リンク機構を有する拮抗筋アクチュエータ	73
4.3.4	リンク機構を有する腱様構造付き拮抗筋アクチュエータ	73
4.4	結言	74
第 5 章	結論	75
5.1	結論	75
5.2	今後の展望.....	76
参考文献	79
Appendix A	細胞の準備と培養	89
A.1	初代細胞の準備	89
A.1.1	初代筋芽細胞.....	89
A.1.2	初代神経幹細胞.....	89
A.2	細胞培養	90
A.2.1	筋芽細胞培養.....	90
A.2.2	神経幹細胞培養.....	90
Appendix B	各種物理モデルの導出方法	91
B.1	収縮による変位がある条件での収縮モデル	91
B.2	骨格筋線維束の収縮力測定方法	91
Appendix C	各種評価方法	92
C.1	免疫染色	92

目次

C.2 凍結切片	93
C.3 HE 染色	93
C.4 RT-PCR	94
Appendix D 装置・薬品・物性値	96
D.1 使用した装置・薬品	96
D.2 使用した素材の物性値	98
謝辞	100

第 1 章 序論

1.1 本研究の目的と意義

本研究の目的は、任意の位置に配置可能な収縮性を有する骨格筋線維束の 3 次元組織を体外にて構築する方法を考案し、拮抗筋構造を有する骨格筋アクチュエータを実現すると共に、創薬や再生医療、ロボット分野への応用可能性を示すことである。

生体外において構築された 3 次元組織は、人工的に構築された臓器や動物実験の代替品として再生医療や創薬の分野にて応用が期待されており、その構築方法の確立は重要な課題である [1]-[4]。様々な種類の生体組織を生体外にて構築することが望まれているが、本研究では骨格筋に注目した。生体外で構築された骨格筋は運動を行うための重要な器官として上記のように再生医療や創薬分野への応用が期待されているだけでなく [5]-[7]、人工食肉として食料品分野への応用可能性 [8]-[10] や生体ロボットの柔軟な駆動素子であるバイオアクチュエータとして工学分野への応用可能性 [11]、[12] があると考えられている。これらの分野に人工的に構築された骨格筋を応用するには、収縮性を有し変位を伴う運動ができる骨格筋組織の構築が必要である。なぜなら、薬物動態として骨格筋の機能を解析するためには、薬物に応じた骨格筋の収縮性の変化を評価する必要があるからである [13]、[14]。また、再生医療デバイスやバイオアクチュエータへの応用を考慮した場合も、骨格筋が収縮性を有していることは重要な要素である。

収縮性を有した骨格筋を体外で構築するためには、生体の骨格筋と同様の構造を付与する必要があると考えられる [5]、[6]。生体の骨格筋は筋芽細胞が多核化した筋線維の集合体である骨格筋線維束から構成されており、この骨格筋線維束が駆動源として収縮運動を担っている

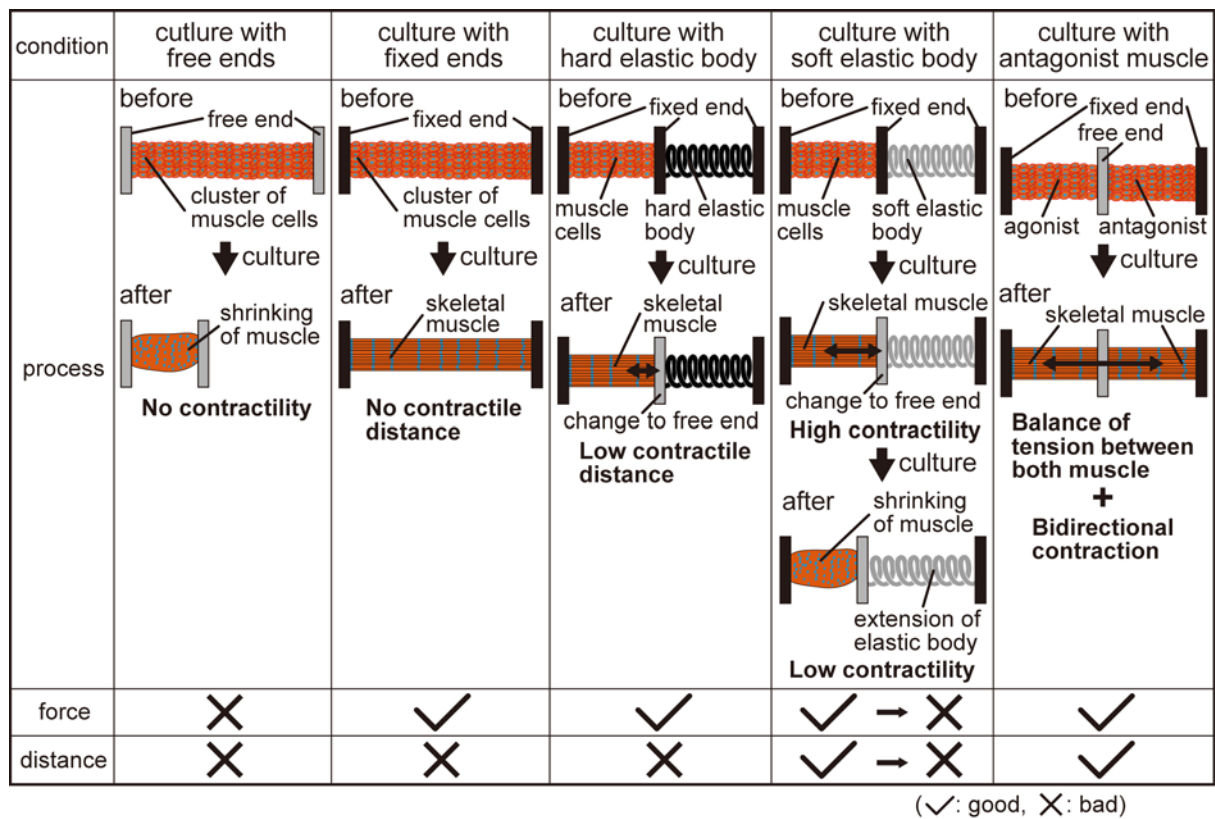


Fig. 1.1 骨格筋線維束の培養特性概念図

[15]. 骨格筋線維束の生体外での構築は様々な研究者により試みられているが、いずれの方法も継続して収縮性を発揮することが困難であった。この問題には骨格筋線維束の培養特性が影響している。骨格筋線維束の培養では、培養の経過と共に収縮性が向上するだけでなく [16]、[17]、骨格筋線維の物としての張力（未収縮運動時の張力）も上昇することが知られている [18]、[19]。加えて、この張力と釣り合う抗力を負荷せず自身の張力による骨格筋線維束の変形がおこると短縮が引き起こされ、収縮性が失われることが知られている [17]、[20]。上記骨格筋線維束の培養特性より、収縮性を維持して骨格筋線維を培養するには、端部に張力同等の抗力を常にかけることで構造を保ち続ける必要がある (Fig. 1.1)。しかし、従来の両端固定 [5]、[6] や硬いバネ様基板 [21]、[22] を用いて構築された骨格筋線維束では、収縮力に対して抗力が大きく骨格筋線維束は収縮量を発揮できなかった。また、柔らかいバネ様基板を用いることで骨格筋線維束の収縮力に対して抗力が小さくなり収縮運動が可能になるが、抗力が小さいことで短縮が発生するため、継続した収縮運動が困難であった。

この問題に対して本論文では、経時的に変化する骨格筋の張力に応じた抗力を与え続けながら培養することを試みる。そのためには、生体と同様に拮抗筋構造を構築して、両筋肉の間で張力のバランスを取りながら培養するのが適していると考えている。生体外にて拮抗筋を含む構造を構築するには、任意の位置に収縮性を有する骨格筋線維束を配置する必要があるが、そのような骨格筋線維束の構築方法は未だ提案されていない。

そこで拮抗筋構造の構築に向けて、任意の位置に配置可能な収縮性を有する 3 次元骨格筋線維束の構築を目指す。本論文では、筋芽細胞をゲル中で培養を行いシート状のゲル構造を作製し、このゲルシートを任意の位置に積層させることで骨格筋線維束を構築する方法を提案する。加えて、本ゲルシートの設計を最適化することにより、骨格筋線維の整列と多核化を制御することも提案する。骨格筋線維の整列と多核化は収縮性に影響を与える要素であると考えられるため、本方法により従来作製された骨格筋線維束以上の収縮性を発揮されることが期待できる。提案の方法は収縮性と配置性を有して骨格筋線維束を構築できるため、様々なデバイス上にて骨格筋線維束の収縮運動を実現することができるようになり、創薬開発用の薬物動態デバイスや工学用のバイオアクチュエータに応用できることが期待される。これらの応用例として、神経の刺激による筋駆動を実現し、神経・筋肉に関連する病気のための薬物動態デバイスとしての応用可能性を検討する。また、空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータを実証することで、従来の骨格筋アクチュエータが培養液中でしか駆動できないという課題を解決し、空気中でもバイオアクチュエータの駆動源として体外で構築した骨格筋線維束を使用可能であることを示す。

さらに、提案のシート積層法を用いて骨格筋線維束をリンク機構を有する構造体上で対称の位置に配置することにより、駆動可能な拮抗筋構造が実現可能であることを実証する。拮抗筋構造においては継続して培養可能かつ収縮性を発揮可能であるため、継続した運動が困難であった従来の骨格筋アクチュエータよりも、バイオアクチュエータとしての応用可能性が高まることを示す。また、拮抗筋構造は生体の構造の模倣でもあるため、拮抗筋を有する骨格筋アクチュエータは薬物動態用のモデルとしても貢献にできると期待される。以上より、収縮性と配置性を有した骨格筋線維束の構築法の考案と、拮抗筋構造の構築は意義深い研究であると考えられる。

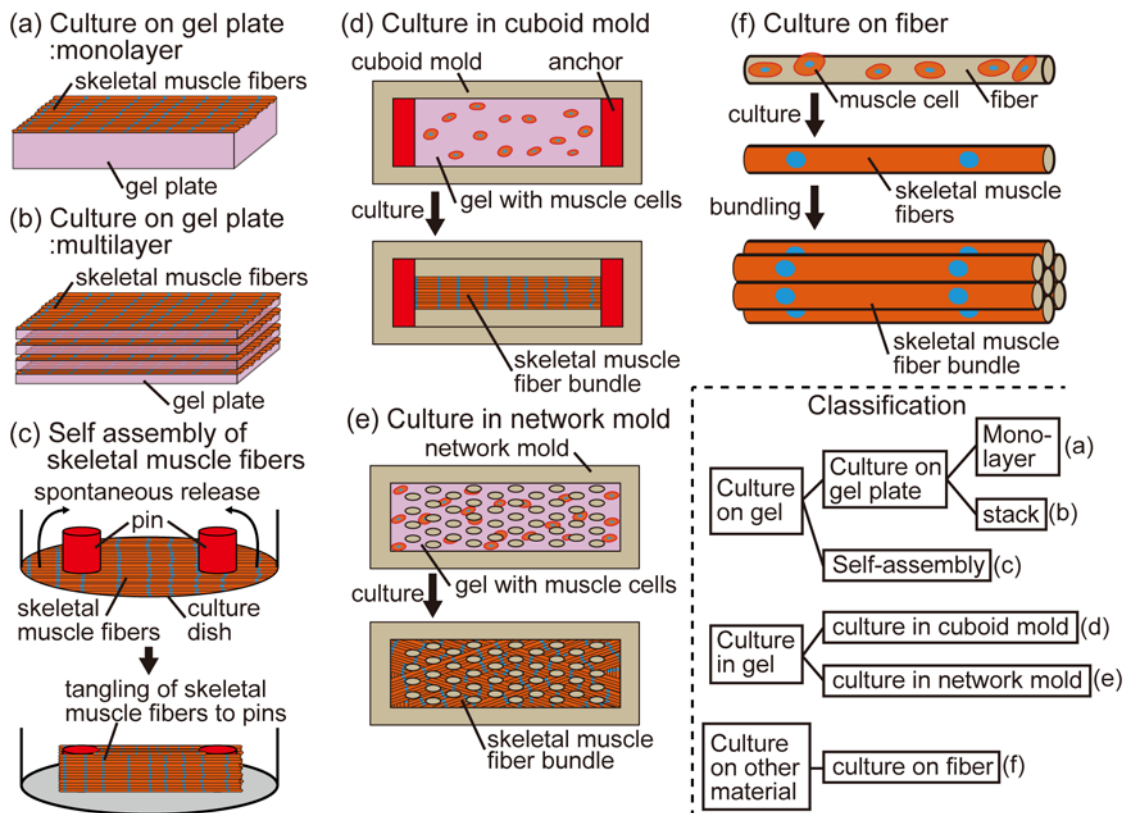


Fig. 1.2 従来の骨格筋線維束の3次元培養方法(6種類)

1.2 研究の背景及び従来研究

1.2.1 3次元骨格筋線維束の構築方法

3次元骨格筋線維束を構築するためには、短縮を防止した状態で筋芽細胞を多核化させ筋線維を形成する必要がある、様々な手法が提案されてきた。これまで報告された筋芽細胞を筋線維へ多核化させる培養条件は①ゲル上での筋芽細胞の培養 [16], [18], [21], [23]-[34], ②ゲル内での筋芽細胞の培養 [17], [19], [22], [35]-[44], ③ゲル以外の物質からなる繊維上での筋芽細胞の培養 [45]-[50], の3種類に大別できる (Table 1.1).

「1.ゲル上での筋芽細胞の培養」では、細胞外マトリクスをゲル化したものを足場として使用し、そのゲル上で筋芽細胞を培養する。ゲル上培養方法はゲル板上培養 [16], [21], [23], [24] と自己筋組織化 [18], [25]-[34] の2つに細分化することができる。ゲル板上培養は、コラーゲンやフィブリンゲルなどの細胞外マトリクスを板状にゲル化させた後、その上に筋芽細胞を培養させ

Table 1.1 従来の3次元骨格筋線維束培養方法まとめ

培養方法		最大収縮力	配置性	最大断面積	アクチュエータへの応用	
ゲル上培養	ゲル板上培養	単層	低 (不明)	高	低 (単層)	有
		積層	低 (0.28 mN) ^[24]	高	中 (40層) ^[24]	無
	自己筋組織化		高 (1.4 mN) ^[26]	低	中 (約0.4 mm ²) ^[26]	無
ゲル内培養	直方体型 モールド内培養	高 (1.68 mN) ^[41]	中	中 (約0.7 mm ²) ^[41]	有	
	ネットワーク型 モールド内培養	高 (1.22 mN) ^[44]	低	高 (約2 mm ²) ^[43]	無	
繊維上培養		低 (0.6 mN) ^[48]	高	低 (単層)	無	

る方法である (Fig. 1. 2(a)). この方法は3次元細胞培養にてトップダウン型培養として知られており、大型の細胞構造体を容易に作ることはできるが、均等な密度に細胞が分布することが困難なため、密に骨格筋線維を構築することが困難である。特に、筋芽細胞はゲル内に遊走する前に表面で骨格筋線維への多核化が開始してしまいゲル板内に浸潤しないため、高密度な骨格筋線維束が構築できず収縮力が低くなると考えられる。この問題を解決するため、Louis Terracio らはゲル板上培養を積層化させた (Fig. 1. 2(b))^[24]。これは培養皿内にて細胞外マトリクスをゲル化させたゲル板上に筋芽細胞を培養後、さらにその上に細胞外マトリクスゲルを形成し細胞を撒き培養するというプロセスを繰り返すことで積層させる方法である。この方法により均等な密度に骨格筋線維を構築することができ収縮力を発揮できるようになったが、その収縮力は低い。これは生体ほど高密度に骨格筋線維を構築することが困難であるためだと考えられる。このようにゲル板上培養で構築された骨格筋線維束は収縮力が低いが、ゲル板を移動させることにより任意の位置に骨格筋線維束を配置することができる利点を有している。ゲル上培養方法のもう一つの方法である自己筋組織化は、細胞非接着性を有するシャーレ内で細胞外マトリクスをシート状にゲル化させ、その上で筋芽細胞を培養する方法である (Fig. 1. 2(c)). 培養が進むと単層の骨格筋線維シートがシャーレから離れ自発的に巻かれていき、シャーレ上に設置したピンに両端を固定される形で円柱型の骨格筋線維束

の3次元組織が構築される。この方法は Robert G. Dennis らが提案し現在まで改良がおこなわれている^{[25], [26]}。Keith Baar らは使用するゲルをフィブリンゲルにすることで迅速に骨格筋線維束を構築することに成功し^[27]、Shuichi Takayama らはシャーレの底に線状のパターンを刻むことにより骨格筋線維の整列を促すことに成功した^[29]。このような改良によって、組織の中心付近は整列している骨格筋線維束を構築することが可能となった。組織中にて一部の骨格筋線維が配向しているため、この方法で構築された骨格筋線維束は高い収縮力を有しているが、培養皿上にあるピンに固定されてしまうため他のデバイスへ骨格筋線維束を移動させることはできない。また、自己筋組織化を応用した方法として、Masamichi Kamihira らは磁性リポソームを導入することで筋芽細胞を磁化させ、シャーレ上で磁石によって凝集させた後に、磁石を外してピンに巻きつける方法を提案している^[30]。高密度に凝集させることにより、骨格筋線維束の3次元組織の中心から外側まで一様に骨格筋線維を配置することに成功しているが、骨格筋線維が整列していないため収縮力は低い。

「2. ゲル内での筋芽細胞の培養」は、溶液状のコラーゲン・ラミニン・フィブリンなどの細胞外マトリクスに筋芽細胞を含有した状態でゲル化した後に培養する方法であり (**Fig. 1. 2(d)**)、Herman H. Vandenburg らが初めてこの方法による骨格筋線維束の構築を提案した^[35]。ゲル内培養方法は直方体モールド内培養^{[17], [19], [22], [36]-[42]}とネットワーク型モールド内培養^{[43], [44]}の2つに細分化することができる。直方体モールド内培養法では、細胞非接着の特性を有する直方体形状のモールドの両端に、ピンなどの骨格筋線維束を固定するための固定部材を配置したものを使用する。モールド内に筋芽細胞を含有したゾル状の細胞外マトリクスを添加しゲル化後培養すると、どこにも接着できない筋芽細胞が両固定部材の周囲と固定部材間を結ぶ線上に凝集する。さらに培養を進めると筋芽細胞が多核化して、固定部材を直線で繋ぐように骨格筋線維束の3次元組織が構築される。この方法で構築された骨格筋線維束は培養に長時間かかるが、固定部材に両端が固定されていることで骨格筋線維の整列が促され高い収縮力を得ることができている。また、複数の骨格筋線維束を構築するのは困難であるが、1つの骨格筋線維束であれば配置性が高く、任意の位置に構築可能である。しかし、この直方体モールド内培養は、細胞の自発的な遊走に最終形状が依存しており再現性が低く、加えて栄養分や酸素の組織内部への供給が困難なため大型の骨格筋線維束の構築が難しい、といった問題がある^[43]。このような直方体モールド内培養の欠点を解決するため、Nenad Bursac らはネットワーク型モールド内培養を提案した^{[43], [44]}。ピンをアレイ状に並べたモールド上に、筋芽細胞を含有したゾル状の細胞外マトリクスを添加しゲル化後培養することに

より、ネットワーク型の骨格筋線維束の 3 次元組織の構築に成功した (Fig. 1. 2(e)). これは、ネットワーク型モールド中で筋芽細胞を培養したことで組織の最終形状がモールド形状に依存するようになったことと、栄養分や酸素がネットワークの隙間から供給されたこと、が影響したと考えられる。各々のピンの大きさや間隔を調整することにより、ネットワーク型筋組織中で様々な状態の骨格筋線維束を構築できるため、骨格筋線維束の形成状態や蛋白質発現の解析に有効な構造となっている。しかし、ネットワーク型のため組織中の骨格筋線維が同一方向に整列しておらず、発生できる収縮力に限界がある。

「3. ゲル以外の物質からなる繊維上での培養」は、筋芽細胞を繊維状の構造体の上で培養することで、繊維に接着した骨格筋線維を構築する方法である (Fig. 1. 2(f)). 使用される繊維は、polyurethane^[48]・polypropylene^[45]・polystyrene^[49]などの合成樹脂や poly-L-lysine (PLL)^[46]・poly(lactic-co-glycolic acid (PLGA))^[47]などの生体適合性のあるポリマー^[50]のマイクロまたはナノ繊維である。このような細い繊維上で筋芽細胞を培養することにより、筋芽細胞は繊維の長軸方向に連なって増殖し、繊維に沿った骨格筋線維が構築される。この骨格筋線維が接着した繊維を束にすることで、整列された骨格筋線維束が構築される。骨格筋線維が接着した繊維は、間隔を設けて置かれた 2 つのピンなどに巻きつけることで、任意の位置に両端がピンにて固定された骨格筋線維束の 3 次元組織を構築することが可能である。しかし、繊維上に骨格筋線維が接着しており、骨格筋線維の収縮がこの繊維の硬さに阻害されるため、低い収縮力しか発揮することができない。

上述の各培養方法のまとめを Table 1. 1 に示す。まず、高い収縮力を有した骨格筋線維束を構築するためには、筋芽細胞と細胞外マトリクスだけで骨格筋線維束を構築し、その骨格筋線維が同一方向に整列する必要があることが分かる。しかし、従来の方法では骨格筋線維の配向性を制御することや、大きな断面積を有した組織を構築できていないため、この 2 点を同時に実現することにより収縮性の更なる向上が見込まれる。ネットワーク型モールド培養の結果より、断面積を向上させるには栄養分や酸素が供給される隙間を設ける必要があることが示されているため、隙間を設けた状態で同一方向に骨格筋線維が整列した組織を大きな断面積を有した形で構築することにより収縮力の向上が可能となると考えられる。次に、任意の位置に骨格筋線維束を構築するためには、ハンドリング可能な骨格筋線維含有構造を作製することが重要であることが分かる。従来自己組織化法やモールド内培養法を用いた骨格筋線維束の構築では、培養開始時に筋芽細胞の培養する位置を決めなければならず、拮抗筋構造などの立体的配置を実現することが困難であった。しかし、ゲル板上培養法や繊維上培養法で作製されたハンドリング可能な骨格筋線維含有構造では、骨格筋線維以外の物質が

多く含まれているため収縮力が低かった。つまり、ハンドリング可能な密な骨格筋線維束組織の構築が、収縮性の高い骨格筋線維束を任意の位置の配置するためには必要であると言える。

3次元骨格筋線維束をアクチュエータに応用することは、ゲル板上培養または直方体モールド内培養で作製された骨格筋線維束でしかなくない。このことから、骨格筋線維束の高い収縮性と配置の容易性が骨格筋アクチュエータの構築には重要であることが分かる。従来の骨格筋アクチュエータの詳細については1.2.3項に記載する。

1.2.2 骨格筋線維の配向性制御

骨格筋線維を同一方向に整列させることは、骨格筋線維束の収縮性の向上に必要な要素である。骨格筋線維の方向性を制御し、配向性の高い骨格筋線維束を構築するためには、骨格筋線維の培養特性を理解する必要がある。生体内において骨格筋線維が整列し同一方向に向いているのは、多核化する前に既に筋芽細胞が整列しているためであることは知られている^[51]。骨格筋線維は遊走性が低く培養後に骨格筋線維の向きを変更するのは困難であるため、体外における骨格筋線維束の構築においても多核化が引き起こされる前に筋芽細胞を整列させることが重要であると考えられる。筋芽細胞を整列させる方法として、微小凹凸上で培養する方法^{[29], [52]-[60]}と細胞の接着領域をパターンする方法^{[16], [23], [61]-[66]}の2種類が数多く提案されている。微小凹凸上で筋芽細胞を培養する方法では、細胞を培養する基板に微小凹凸を設けることで、凸部分または凹の部分といった細幅領域にのみ筋芽細胞が接着し、筋芽細胞を一直線に並べることができる。また、凸部分または凹部分の幅を変化させることにより、筋芽細胞の配向性を制御することができる。この方法は使用する基板の種類に問わず適用でき、ガラスやpolystyreneなどの硬い材料から^{[29], [52]-[54]}, polyurethane^[58]やpoly(dimethylsiloxane) (PDMS)などの柔らかめの合成樹脂^[53]や、polyethylene glycol (PEG)^[53]やgelatin methacrylate (GelMA)^{[55], [57], [59]}などのハイドロゲルまで、様々な種類の基板上での筋芽細胞の整列に成功している。ただし、この方法は微小凹凸を有する基板が必要になるため、骨格筋線維束の3次元組織の構築には応用することは困難である。細胞の接着領域をパターンする方法では、平坦な基板上で細胞が接着可能な領域を幅細い形状にパターンすることにより、基板に接着した筋芽細胞が一直線に並ぶ。細胞が接着可能な領域は、フォトリソグラフィを用いて細胞非接着表面(MPCポリマーコート^{[16], [23]}など)もしくは細胞接着表面(フィブロネクチン^{[63], [64], [66]}やコラーゲン^[61], ラミニン^{[62], [65]}など)をパターンニングすることで形成できる。また、

この方法でも細胞の接着領域の幅を変化させることにより筋芽細胞の配向性を制御することができるが、基板を必要とするため骨格筋線維束の 3 次元組織構築に応用することはできない。しかし、上記の結果より、細胞の存在領域を制御することで筋芽細胞の配向性を制御できることが示されているため、3 次元培養においても細胞の存在領域を制御することで筋芽細胞の配向性を制御できることが予想される。

骨格筋線維の構築には筋芽細胞の多核化が必要となる。引用 [43] より、細幅領域で培養された筋芽細胞は多核化が促進されることが示唆されている。この結果から、筋芽細胞の配向性と同様に筋芽細胞の多核化も、3 次元培養における細胞の存在領域の寸法を変化することで制御できることが期待される。

1.2.3 筋肉を駆動源とするバイオアクチュエータ

骨格筋を駆動源とするバイオアクチュエータは、生体の運動特性の解析や薬物動態試験への応用が期待されている。さらに、骨格筋は生体内に存在するリニアアクチュエータとして見なすことができ、工学的にも応用可能な要素である。骨格筋線維は電気刺激により活性化するカルシウムイオンチャンネルを筋小胞体に有しているため、骨格筋繊維の収縮は電気刺激に同調して発生し、その収縮力は電気刺激の強さと時間に応じて制御できることが知られている [67]。このような特性を生かし、カエルから取り出した骨格筋を駆動源として使用することで培養液中を泳ぐロボットが既に実現されており [68]、生体外で構築された骨格筋線維束も同様にアクチュエータへの搭載が目指されている。しかし、骨格筋繊維は筋芽細胞からの多核化が必要、かつ骨格筋線維が物としての張力が高く扱いづらいため、アクチュエータへの応用例が少ない。そこで、心筋を用いたアクチュエータも同時に例示することにより、心筋と骨格筋の比較から骨格筋線維束をバイオアクチュエータへ応用した際の問題点を明らかにする。

従来報告された体外で構築された筋肉を用いたアクチュエータは、① 1 細胞 [69]-[71]、② 基板上の 2 次元組織 [72]-[82]、③ 3 次元組織 [21]、[22]、[38]、を用いた研究の 3 種類に分類される。心筋 1 細胞を用いたアクチュエータには、心筋細胞のピラーアレイ上への播種したデバイス [69] または心筋細胞の片端部をピラー先端にもう一方の端部をピラーの根元付近へ接着させたデバイス [70]、[71] がある (**Fig. 1.3(a)**)。両アクチュエータとも、心筋細胞の収縮によりピラーの屈曲が実現される。ピラーの屈曲状態から心筋細胞の収縮力の推定が可能となるため、心筋 1 細胞の収縮力の解析に応用できると考えられる。一方、骨格筋線維 1 本を用いたアクチュ

他者の著作権に関わる図版を使用しているため、本図を非公開とする

Fig. 1.3 筋肉を用いたバイオアクチュエータの従来研究 (引用 ; (a):[71], (b-i):[72], (b-ii):[80], (c-i):[74], (c-ii):[73], (d-i):[76], (d-ii):[77], (d-iii):[78], (e):[79], (f):[21], (g):[22]

エータの例は乏しい。これは筋芽細胞を多核化して、骨格筋線維 1 本のみを構築するのは困難であるためだと考えられる。

筋肉細胞を 2 次元培養した基板を用いたアクチュエータでは、筋肉の収縮力によって基板を屈曲させることを基本動作としている。基板上での骨格筋線維または心筋細胞の方向性は、1.2.2 項に記載のタンパク質のパターニングにより制御が可能のため、基板を任意の方向にのみ屈曲することができる (**Fig. 1.3(b)**)^{[72], [80]}。心筋細胞を培養した基板の応用例として、基板を収縮させることにより変形させて送液するポンプ (**Fig. 1.3(c)**)^{[73]-[75]} や、培養皿上を歩くデバイス (**Fig. 1.3(d)**)^{[76]-[78]}、さらに泳ぐことができる人工クラゲ (**Fig. 1.3(e)**)^[79] が実現されている。骨格筋線維を培養した基板は、ピラーの屈曲^[81] やピンセット型デバイス^[82] への応用が提案されている。しかし、骨格筋線維を用いたアクチュエータのいずれも収縮量が数 μm と小さく実用が困難なものになっており、ピンセット型デバイスで実際に物を把持することなどは困難である。これは、基板上に骨格筋線維を単層で培養しているため収縮力が小さいことと、細胞牽引力が大きいために培養の際に基板を硬くしなければならないことが影響していると考えられる。実際に **Fig. 1.3(b)** の (i) と (ii) の例を用いて心筋細胞と骨格筋線維を基板に培養した際の収縮量を比較すると、骨格筋線維を用いた基板の方が収縮量が少なくなっていることから、基板上での培養に骨格筋線維が適していないことが分かる。

3 次元筋組織を用いたアクチュエータには、主に骨格筋線維束が使用されている。体外で構築された骨格筋線維束の収縮によって、骨格筋線維束の端部に固定された物体を動かすことは既に実現されている^[38]。しかし、この実験系では骨格筋線維束の張力と釣り合う負荷がかけていないため、第 1.1 節における柔らかいバネ様基板上における骨格筋線維束の培養と同様に、短縮を引き起こし収縮性を失うことが予想される。生体外にて構築した骨格筋線維束をデバイスに取り付けた報告として、シリコンデバイス上に骨格筋線維束の 3 次元組織 (ゲル板上培養で構築) を設置させ培養皿上での歩行を目指した研究 (**Fig. 1.3(f)**)^[21] と、骨格筋線維束の 3 次元組織 (直方体型モールド内培養) をピンセット型デバイスに設置させピンセットによる物体把持を目指した研究 (**Fig. 1.3(g)**)^[22] がある。両者の研究とも骨格筋線維束が $10 \mu\text{m}$ 以下の収縮量しか実現できず、実際には歩行または物体把持には成功していない。

これは第 1.1 節における硬いバネ様基板上における骨格筋瀬に即の培養と同様で、デバイス自体が収縮力に対して硬すぎるため収縮量を発揮できなかったと考えられる。

上記をまとめると、心筋細胞とは異なり、骨格筋線維束を用いたアクチュエータにおいては収縮量が乏しいことが問題であることが分かる。これは従来のアクチュエータにおいては、デバイスが収縮力に対して硬すぎたためだと考えられる。また、骨格筋線維は多核化が必要かつ張力が大きいことから、デバイスを変形しやすくすることでは短縮が発生し、この問題を解決することができない。つまり、収縮性を有する骨格筋線維束に張力同等の負荷をかけた状態で設置することで、大きく駆動可能なアクチュエータが構築できると考えられる。加えて、従来の研究において筋肉を用いて模倣できた生体の動きはクラゲのような水中で活動できる生物のみであった^[79]。これは筋肉は細胞のみで構成されており、培養液中でのみ活動可能なためである。一方、陸上生物も骨格筋の収縮に基づいて活動しているが、その体は空气中で運動している。これは陸上生物の骨格筋は細胞外マトリクスや皮膚で覆われており、陸上においても骨格筋は湿潤環境に居続けることができるためである。生体外で構築された骨格筋線維束も陸上生物と同様に空气中で活動できるようになることで、培養液中に限らない運動や物体操作が可能になると考えられ、バイオアクチュエータとしての応用可能性が広がると期待される。

1.2.4 骨格筋線維束の薬物動態モデルへの応用

生体外で構築された骨格筋線維束は薬物動態モデルへの応用も期待されている。生体内における骨格筋の収縮は、骨格筋線維上の神経筋接合部に存在するアセチルコリン受容体の集合体に、運動ニューロンから放出される神経伝達物質であるアセチルコリンが結合することにより発生する^[83]。近年、生体外における神経筋接合部の再構築は薬物動態用の実験モデルとして高い注目を集めており、重症筋無力症やランバート・イートン症候群、筋萎縮性側索硬化症などの神経-筋肉疾患に関する新規治療法の開発へ応用することが望まれている^{[84]-[87]}。神経筋接合部の再構築を実現するために、様々な運動ニューロンと骨格筋線維の共培養システムが培養皿上で確立されている^{[87]-[90]}。しかし、従来の共培養システムは 2 次元培養系で実現されているため、骨格筋線維は端部だけでなく全体が培養皿に接着している。そのため、骨格筋線維の成長具合や収縮特性が生体の骨格筋線維と異なることが予想される^{[29], [46], [57]}。以上のことから、3 次元骨格筋線維束で運動ニューロンとの共培養を実現し、生体に近い環境にて神経筋接合部を構築することが望まれている。

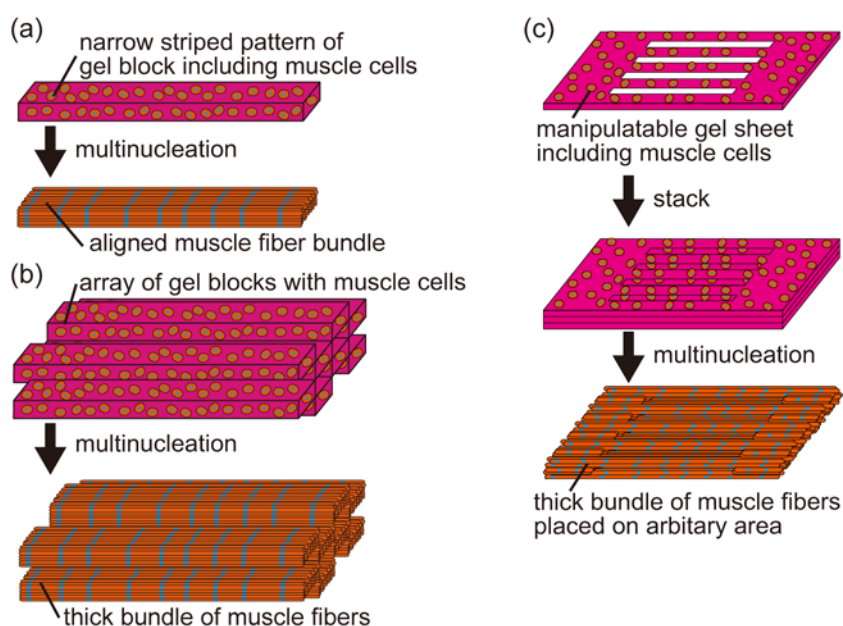


Fig. 1.4 本研究で提案する骨格筋線維束の構築方法概念図

加えて、骨格筋線維束を用いて拮抗筋構造を構築すると、さらに薬物動態モデルへの応用可能性が高まると考えられる。生体の運動は、骨格筋の収縮により腕や足といったパーツを動かすことによって達成されている。この腕や足の部分では、上腕二頭筋と上腕三頭筋に代表されるように、主動筋と拮抗筋が対になって配置されている。主動筋と拮抗筋はお互いに張力を発生しており、両者の張力の釣り合いにより筋肉の構造が維持され、主動筋または拮抗筋の収縮力により生体の身体運動が発生することが知られている^[91]。そのため、体外で構築された主動筋と拮抗筋を有する実験系は、生体の身体運動を表すことのできる薬物動態モデルとしての応用が期待される。特に、主動筋と対抗筋の力の釣り合いは加齢と共に変化していくことが知られている^[92]ため、高齢者向けの筋治療薬や治療法の開発に貢献できると考えられる。

1.3 本研究で提案する骨格筋線維束とその応用

1.3.1 骨格筋線維束の構築法

本研究では、拮抗筋構造の構築への応用を目指し、まず任意の位置に配置可能な収縮性を有する3次元骨格筋線維束の構築方法を提案する。ここでの「任意の位置に配置可能」とは、

他のデバイスの任意の位置に安定して骨格筋線維束を配置できるという特性である。また、「収縮性」とは他のデバイスに本骨格筋線維束を設置した時に、収縮運動により変位を生み出せることであるとする。つまり、骨格筋線維束自身が有する張力よりも十分に大きな収縮力を発揮できる骨格筋線維束の構築を目指す。従来の方法で作製された骨格筋の3次元組織において骨格筋自身の張力と収縮力がほぼ同等であるという結果^[25]からも、張力より大きな収縮力を発揮できる骨格筋線維束を構築することで「収縮性」が達成されると考えられる。

上記課題を達成するため、細胞外マトリクスの細幅ゲル構造中で筋芽細胞を多核化させて、成熟かつ配向した骨格筋線維束の構築を実現する (**Fig. 1. 4(a)**)。これは 1.2.2 項で示された筋芽細胞の培養特性より、細幅領域内での3次元培養では多核化と配向の促進が期待されるためである。このように同一方向に整列かつ成熟した骨格筋線維束を作製することで収縮力の向上を試みる。ただし、細幅ゲル構造中での培養では細幅の骨格筋線維束しか構築することができないため、発生できる収縮力に限界がある。そこで、筋芽細胞含有の細幅ゲル構造を3次元的にアレイ化することで、構築される骨格筋線維束の断面積を上昇させて収縮力の向上を目指す (**Fig. 1. 4(b)**)。このような高い収縮力を有する骨格筋線維束の配置性を高めるため、筋芽細胞含有の細幅ゲル構造の3次元アレイ化の際に、細幅ゲル構造が2次元アレイ化された筋芽細胞含有のゲルシートの積層を試みる。このゲルシートは持ち運び可能なため、培養液中で任意の位置に配置することが可能となる (**Fig. 1. 4(c)**)。

本論文では、幅を制御していないゲル構造中で構築された骨格筋線維束では自身の張力と収縮力はほぼ等しいが、ゲルシートの積層で作製された骨格筋線維束の収縮力が張力より大きいことを明らかにする。さらに、骨格筋線維束を電極が配置されたデバイス上で構築でき、電極から供給される電気刺激によって骨格筋線維束が収縮できることを示す。また、この骨格筋線維束の収縮により、従来のデバイスにおける変形駆動量である $10\mu\text{m}$ よりも大きい変形駆動を実現可能であることを示す。

提案の骨格筋線維束はデバイスを変形させることが可能なだけでなく、様々な分野へ応用可能である。本論文においては、①神経の刺激による筋駆動、②空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータを実証し、その応用可能性について検討する。神経刺激による筋駆動の実現のために、培養液を減らした状態での神経幹細胞スフェロイドと骨格筋線維束の接着による、安定的な神経幹細胞と骨格筋線維の共培養方法を提案する。これにより従来では困難であった神経細胞と骨格筋細胞の3次元組織中での共培養が実現される。また、提案の筋芽細胞含有の細幅ゲル構造から作製した同一方向に整列した骨格筋線維束上で神経筋接合部を構築することにより、神経刺激によって骨格筋線維は全て同一方向に収縮するようになり大きな駆

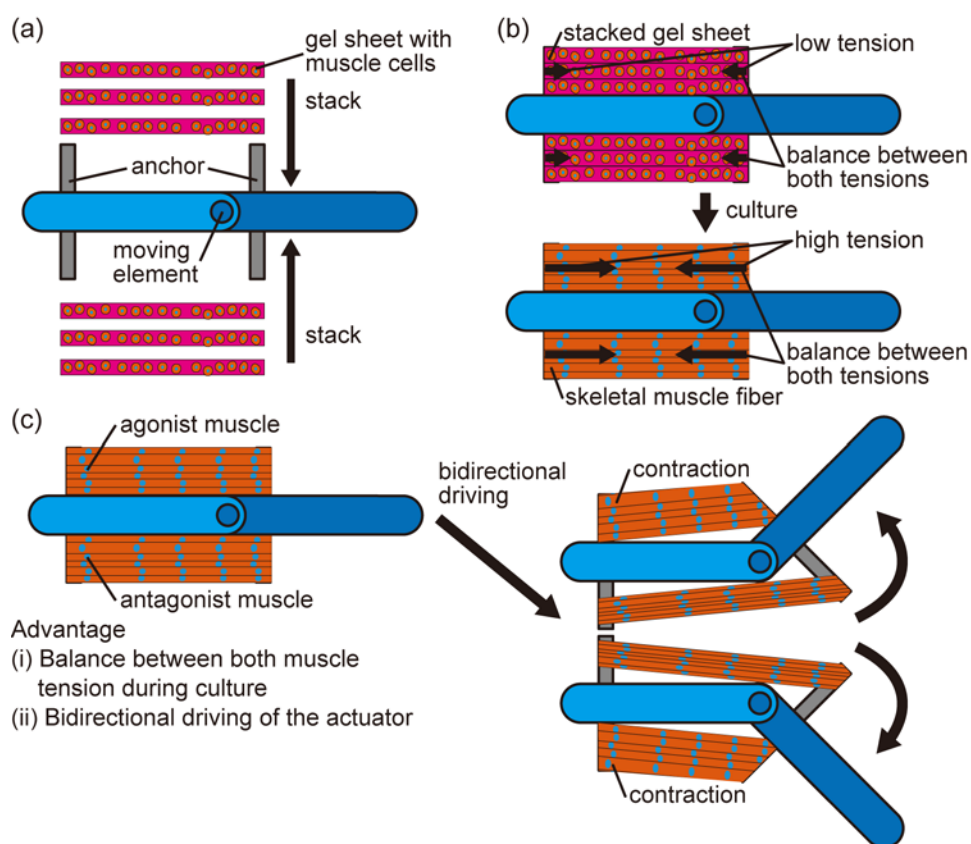


Fig. 1.5 (a) 拮抗筋構造の構築概念図 (b) 培養期間中の両筋肉の張力の釣り合い (c) 拮抗筋を有する骨格筋アクチュエータの駆動概念図

動として観察可能となる。本特性を実証するため、神経を刺激し神経伝達物質を発生させた時の骨格筋線維束の収縮と、筋弛緩剤で神経筋接合部を無効化した時の骨格筋線維束の痙攣、神経筋接合部を無効化した後の神経伝達物質への反応性、を評価する。このように、3次元組織中で様々な状態での収縮特性を観察できることを示すことで、薬物動態実験への応用可能性を実証する。空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータにおいては、骨格筋線維束を中空部分を有したコラーゲングル構造中に包埋する方法を提案する。コラーゲングル構造中に骨格筋線維束があるため、空気中であっても骨格筋線維束は湿潤環境を維持し活性を保つことができる。本特性を実証するため、骨格筋線維束の両端に電極が配置されたデバイスと共にコラーゲングル構造内に包埋し、空気中で電気刺激を与えた時の収縮特性を評価する。加えて、このアクチュエータを用いて物体操作を実現することにより、空気中で物体に対して仕事を行うことが可能であることを示す。

1.3.2 拮抗筋を有する骨格筋アクチュエータ

拮抗筋を有するアクチュエータの構築においては、1.3.1 項に記載の筋芽細胞含有のゲルシートの積層法を用いて、駆動部を軸とした対称の位置へ骨格筋線維束を構築し拮抗筋構造を実現する (**Fig. 1. 5(a)**). 上記のような骨格筋線維束を立体的に配置した拮抗筋構造の構築は従来の骨格筋線維束の構築方法では実現困難であった。提案の方法では筋芽細胞含有のマトリゲルシートを持ち運び積層することにより、任意の位置に安定的に骨格筋線維束を構築することが可能となっている。一方、ゲル内培養方法ではデバイス上でのゲル化が必要となるため、ゲル溶液が流れてしまいデバイス上の任意の複数の位置において同時期でのゲル化が困難となる。また、ゲル化の時期をずらした場合も、複数の位置のゲル化が完了するまで最初に構築したゲルが長時間空气中に放置されてしまうため、含有された筋芽細胞が活性を失ってしまい骨格筋線維束の構築が困難になってしまう。ゲル上またはファイバ上での培養方法では、任意の位置に骨格筋線維束を配置することが可能であるが、ゲルまたはファイバの硬さによって収縮が妨げられているため、自由に収縮することが困難となっている。以上のことから、提案の方法は拮抗筋付き骨格筋アクチュエータを構築するに当たり、従来の方法よりも適していると考えられる。

拮抗筋構造の利点として、主動筋と拮抗筋の間で常に張力の釣り合いが取られることがある (**Fig. 1. 5(b)**). 従来の骨格筋アクチュエータでは、骨格筋線維束の端部を固定部材やバネ様基板で固定することにより、骨格筋線維束の張力と固定部材やバネ様基板が発する抗力の間で力の釣り合いが取れている。しかし、第 1.1 節で述べたとおり、従来の構造では継続して骨格筋線維束の収縮性を発揮することが困難である。拮抗筋構造が実現されると、筋芽細胞の集合体から多核化して骨格筋線維束が構築されるまで常に主動筋と拮抗筋の間で張力との釣り合いが取られ、骨格筋線維束の形状が維持されたままの培養が可能となる。さらに、骨格筋線維束の物としての張力は収縮力に比べて小さいため、両骨格筋線維束ともに収縮性を発揮することができる。その結果、拮抗筋構造を用いることで、駆動部を両方向に稼働させることが可能となる (**Fig. 1. 5(c)**). 以上の特性により、提案の拮抗筋を有する骨格筋アクチュエータは伸展・収縮運動が可能となるだけでなく、従来の骨格筋アクチュエータよりもその運動が継続して実現できることを示す。

1.4 本論文の構成

第1章 序論

本研究の目的と本研究に関連する各分野の背景および従来の研究についてまとめた。また、本研究で提案する手法の特徴について説明し、その意義について述べた。

第2章 骨格筋線維束の設計

体外で構築された骨格筋線維束の収縮を表現する物理モデルを提案し、骨格筋線維束の配向性と多核化の促進度が収縮力に影響する程度を検証する。さらに、骨格筋線維束長の変化量と収縮速度が収縮力と張力に与える影響について検証する。加えて、デバイス上に骨格筋線維束を配置した際に、骨格筋線維束の収縮力とデバイスの変形量の関係を明らかにする。最後に、本研究で提案する骨格筋線維束の具体的な構築方法と骨格筋線維束を配置するデバイスの作製方法について記述する。

第3章 骨格筋線維束の構築と特性評価

第2章で作製した骨格筋線維束の収縮を表現する物理モデルと骨格筋線維束の収縮力の相関性を評価する。加えて、シート積層法で作製された骨格筋線維束が従来の方法で作製した骨格筋線維束より、高い収縮性を有していることを示す。また、電極を含むデバイス上に骨格筋線維束を構築し、デバイス上での培養が骨格筋線維束に与える影響について検討する。

第4章 骨格筋線維束の応用検討

提案の方法により作製した骨格筋線維束を用いて、単一骨格筋線維束を用いた応用と拮抗筋構造による応用を検討する。単一骨格筋線維束を用いた応用例として、神経の刺激による筋駆動と空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータを実現し、薬物動態モデルやバイオアクチュエータへの応用可能性を実証する。最後に拮抗筋構造による応用例として、拮抗筋構造をリンク機構を有するアクチュエータを上で実現し、提案の骨格筋線維束作製方法が骨格筋線維束の立体的配置に適していることを示す。加えて、拮抗筋構造を実現することで伸展・収縮運動を継続して行えることを示す。

第5章 結論

本研究で得られた成果についてまとめ、今後の展望について述べる。

第 2 章 骨格筋線維束の設計

2.1 緒言

この章では初めに，生体外において作製した骨格筋線維束の収縮力・収縮量を推定するための物理モデルを骨格筋の力学的性質から提案する．さらに，骨格筋線維束の長さ変化と収縮速度が収縮力に与える影響について検討する．最後に，骨格筋線維束の構築方法と電極を有するデバイスの作製方法について述べる．

2.2 骨格筋線維束の駆動モデル

2.2.1 骨格筋線維束収縮力モデル

生体外で構築された骨格筋線維束が収縮を起こした時の収縮力をモデル化することを試みる．骨格筋線維の収縮はミオシン - アクチン間における滑り運動によって行われている [93]、[94]．骨格筋繊維が束になった骨格筋においては，発生する収縮力が骨格筋長の変化量に依存するという力 - 長さ関係 [95] と，発生する収縮力が収縮速度に依存するという力 - 速度関係 [96] という 2 つの基本的な関係があることが明らかになっている (**Fig. 2. 1**)．この際、骨格筋の収縮力 F は筋活動レベル α ($0 \leq \alpha \leq 1$) の増加によって大きくなる．ここでの筋活動レベル α は，骨格筋に入力される刺激量に応じて変化する骨格筋の活性化程度を表している．骨格筋の収縮力 F は筋活動レベル α と活動レベル α が 1 の時における収縮力を表す骨格筋長 L を基にした非線形関数 $g(L, \dot{L})$ の積で表されると仮定する．ここで $g(L, \dot{L})$ を任意の筋長 L_0 と収縮速度 0 の近傍でテイラー展開し 2 次項以上を無視すると，

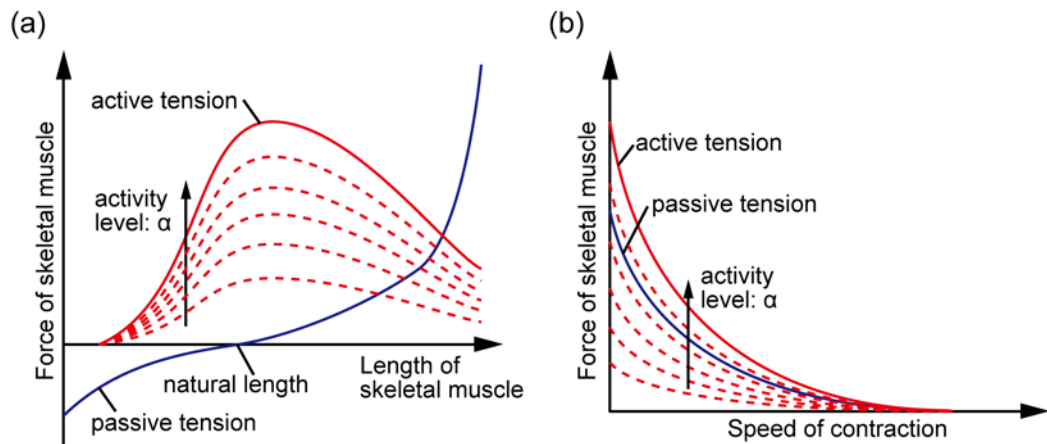


Fig. 2.1 能動的張力・受動的張力と活動レベルの関係概念図
(a) 力 - 長さ関係 (b) 力 - 速度関係

$$F \approx \alpha \left(g(L_0, 0) + \frac{\partial g}{\partial L} \Big|_{\substack{L=L_0 \\ \dot{L}=0}} (L - L_0) + \frac{\partial g}{\partial \dot{L}} \Big|_{\substack{L=L_0 \\ \dot{L}=0}} (\dot{L} - 0) \right) \quad (2.1)$$

と収縮力は表せられる。なお、 F_0 は骨格筋長 L_0 で活動レベル α が 1 の時の収縮力、 k は骨格筋の仮想弾性定数、 c は骨格筋の仮想粘性定数、 x は $x = L - L_0$ で表せられる骨格筋長の変化量 (収縮方向が正) とすると、式 (2.1) は、

$$F \approx \alpha(F_0 - kx - c\dot{x}) \quad (2.2)$$

という骨格筋の収縮力モデルとして見なせることが知られている^[97]。この収縮モデルは骨格筋の可変粘弾性特性を表しており、筋電位による義手の位置制御能力を高めることなどに応用されている。しかし、骨格筋の収縮力は刺激を受けて発生する能動的張力と骨格筋の物体としての張力である受動的張力とその和である総合的張力に分類することができるが^[98]、本収縮力モデルは総合的張力のみを表している。そのため、筋活動レベル α が筋肉の活性化レベルと同義になっておらず、筋肉が活性化されずに受動的張力のみが機能している場合の張力を表現することができない。骨格筋を駆動素子として使用する際は能動的張力と受動的張力を分けて考える必要があるため、本収縮力モデルを改変し両張力を別々に表すことを試みた。

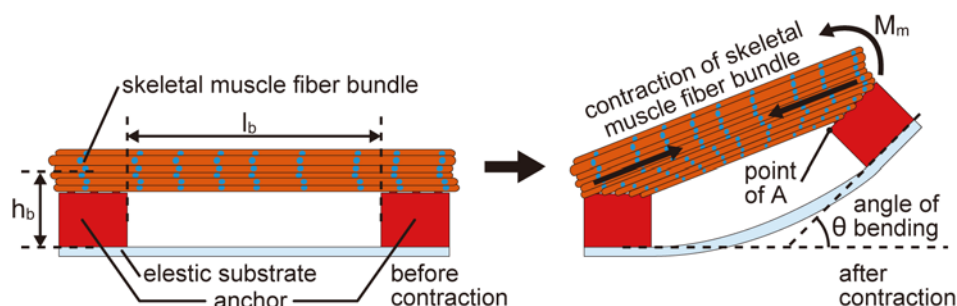


Fig. 2.2 固定部材付き弾性基板の屈曲概念図

本部分においては雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、非公開とする

2.2.2 収縮による変位がない条件での収縮力モデルの適用

2.2.3 収縮による変位がある条件での収縮力モデルの適用

本項においては雑誌掲載の形での刊行(5年以内に出版予定)が予定されるため、非公開とする

2.2.4 弾性基板の変形モデル

骨格筋線維束の収縮力により弾性基板を変形させる場合を考える。刺激が骨格筋線維束に与えられると、骨格筋線維束は自身の長さを変化させながら弾性基板に収縮力を負荷していくことで変形を引き起こす。この際、骨格筋線維束の収縮力と弾性基板の変形がもたらす抗力の間で常に力の釣り合いが取られる。つまり、式(非公開)に従い骨格筋線維束から収縮力が発生し、弾性基板の変形がもたらす抗力差は式(非公開)に従うものと考えられる。

本項では、弾性を有した薄膜の基板の上に固定部材と共に骨格筋線維束を配置した条件での基板の変形量について検討する(Fig. 2.2)。骨格筋線維束が収縮することにより、骨格筋線維束の端部が固定された固定部材に収縮力が負荷される。また、骨格筋線維束の収縮力が固定部材に負荷された時、固定部材の高さ h_b に応じたモーメントが基板に負荷される。以上の力とモーメントは、屈曲した基板の抗力と抗モーメントと釣り合うと考えられる。しかし、モーメントと力の両方が薄膜の弾性基板に負荷されているため、基板の曲げモーメントと座

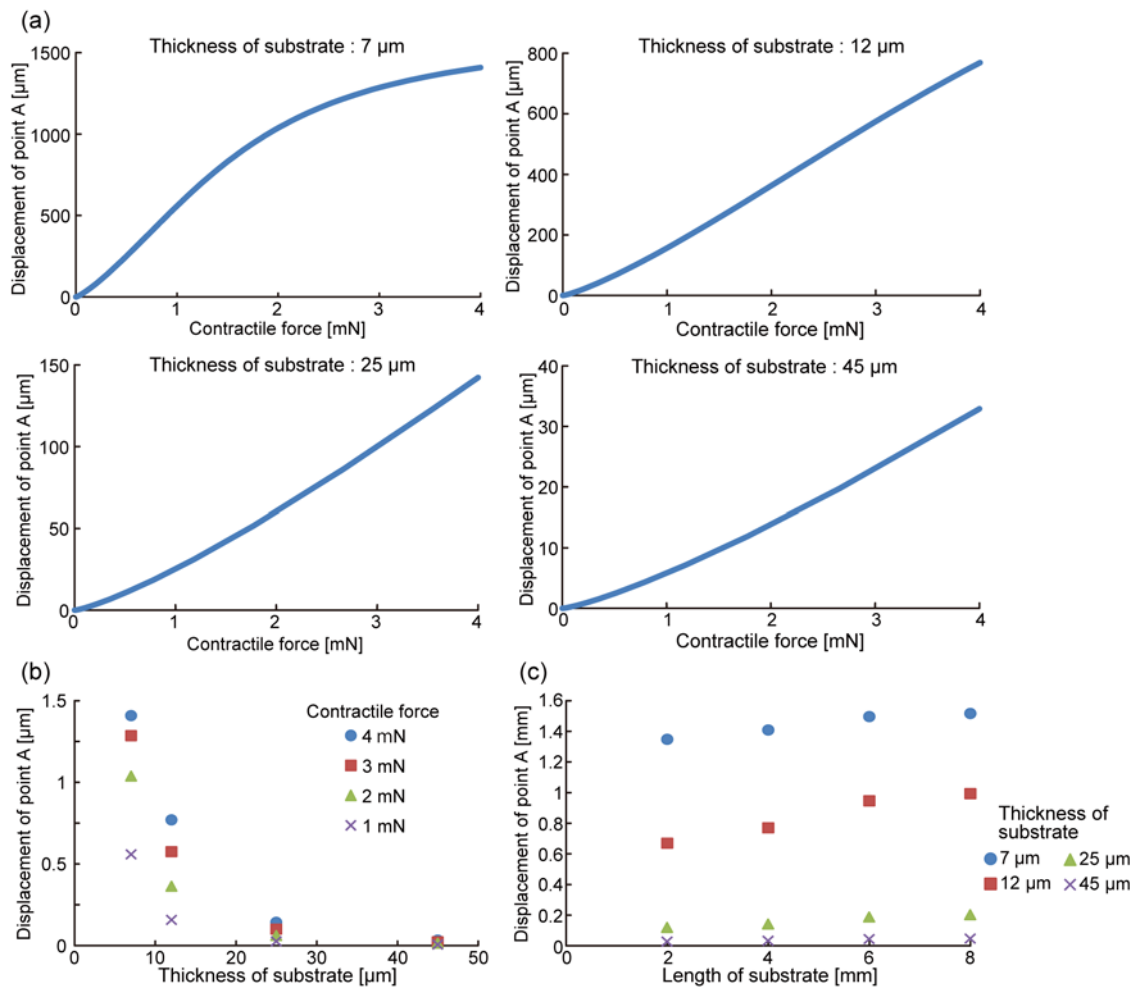


Fig. 2.3 シミュレーションにより推定した弾性基板の変形 (a) 収縮力と参照点 A の移動量の関係 (b) 基板厚さと参照点 A の移動量の関係 (c) 基板長さとの参照点 A の移動量の関係 (収縮力 4 mN の時)

屈の両方を考慮する必要があり、式で現象を表現することが困難である。加えて、薄膜基板内において均一に応力が分布するとは限らない。そこで、有限要素法を用いたシミュレーションを行い、**Fig. 2.2**における参照点 A の水平方向移動量を推定した。シミュレーションに当たっては Abaqus 6.9 student edition を用いた。基板と同寸法の梁の片端を完全固定、もう一方の端部に骨格筋線維束の中心部までの高さ h_b の長さを有する剛体を結合させた。この剛体の高さ h_b の部分に筋の収縮力 F を負荷したシミュレーションモデルを使用することで、基板の片端部では剛体からもたらされるモーメント M_m が負荷されるようになっている。なお、本

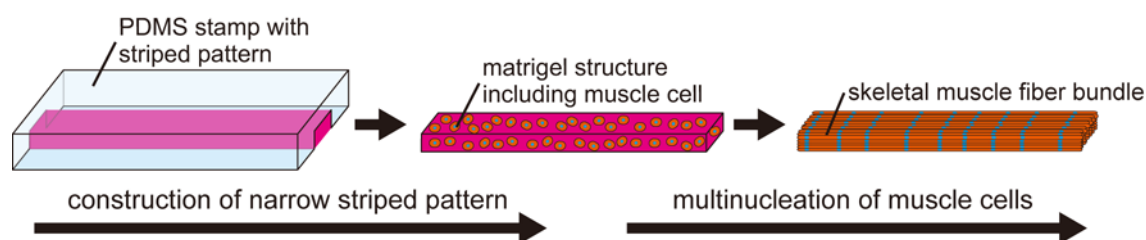


Fig. 2.4 筋芽細胞含有細幅マトリゲル構造の構築方法 概念図

シミュレーションを行うに当たり、付録第 D.2 節に記載の物性値を用いて実際に使用した弾性基板の機械特性を有するモデルになるよう試みた。このモデルを使用して推定した参照点 A の水平方向移動量を Fig. 2.3 に示す。Fig. 2.3(a) は参照点 A の水平方向移動量と骨格筋線維束の収縮力の関係を表し、Fig. 2.3(b) は各収縮力における基板の厚さと参照点 A の水平方向移動量の関係を表している。基板が厚い場合は、収縮力の増加に対してほぼ線形に参照点 A の水平方向移動量が増加することが分かった。しかし、基板が $7\ \mu\text{m}$ まで薄くなると、大きな収縮力が負荷された時の変形量が線形近似から外れていく傾向が見られた。また、基板の厚さが厚くなるにつれて、参照点 A の移動量が減少していくこともこの結果より分かった。Fig. 2.3(c) は骨格筋の収縮力が $4\ \text{mN}$ である時の基板の長さとの参照点 A の移動量の関係を示している。基板の厚さに関わらず、基板の長さを長くすると参照点 A の移動量は増えていくことが分かった。また、基板の厚さが $7\ \mu\text{m}$ の時は基板長を長くした時の参照点 A の移動量増加が、基板の厚さが $12\ \mu\text{m}$ の時の移動量増加よりも少なくなることが示された。つまり、基板が薄すぎると基板長の増加の影響を受けにくくなると考えられる。以上より、弾性基板上の参照点 A の移動量は、骨格筋線維束の収縮力の増加に対して一定以上の基板厚さがある場合はほぼ線形に増加し、基板の厚さと長さの変化によっても制御できることが示された。

2.3 骨格筋線維束の作製方法

本節では、筋芽細胞を含有したゲル構造の寸法をパターンニングにより制御した状態で骨格筋線維束を構築する方法と、ゲルシートの積層によりゲル構造を 3 次元アレイ化して骨格筋線維束を構築する方法について記述する。また、独立かつ選択的に電気刺激を骨格筋線維束に与えるための固定部材付き柔軟電極基板の作製方法について記述する。

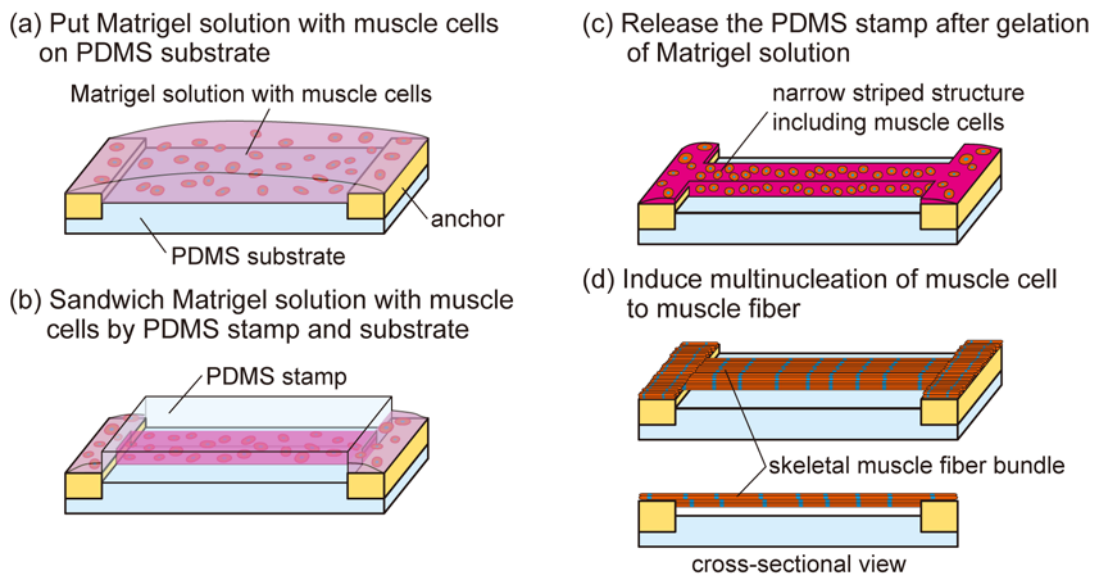


Fig. 2.5 ゲル構造のパターニングによる骨格筋線維束の作製方法 (©2013 Elsevier)

2.3.1 筋芽細胞含有ゲル構造のパターニング

本論文では、筋芽細胞を細幅マトリゲル構造中で培養することにより骨格筋線維束を構築する。マトリゲルは柔らかい細胞外マトリクスのため骨格筋収縮への影響が少ないことが見積られることと、筋芽細胞をマトリゲル中で培養すると骨格筋線維の特性が向上することから使用した^[41]。筋芽細胞を含む細幅マトリゲル構造を構築するために、光造形装置 (Perfactory, Envision Tec., Germany) で作製したモールドから転写した PDMS スタンプと基板を使用した (Fig. 2.4)。PDMS スタンプの形状により筋芽細胞を含むマトリゲル構造の寸法を調整することで、細幅マトリゲル中での筋芽細胞の培養と骨格筋線維への多核化を実現し、成熟度が高く骨格筋線維長軸方向の存在確率分布が長軸方向にピークを持つ骨格筋線維束の構築を目指す。また、この時のマトリゲルに含まれる筋芽細胞の濃度と PDMS スタンプを寸法を調整することで、式 (非公開) における ρA を変化させることができる。

具体的な骨格筋線維束の作製方法を以降に記述する (Fig. 2.5)。まず PDMS スタンプと基板の表面に O_2 プラズマを当てることで親水化した後、エタノールで洗浄し 2 時間紫外線を照射することで滅菌を行った。その後、PDMS スタンプと基板の表面にエタノールに溶かした phosphorylcholine-based (MPC) ポリマー (0.5 wt%) を塗布し 65°C で 1.5 時間熱することで、MPC ポリマーを固定し PDMS 表面に細胞が接着できないようにした。

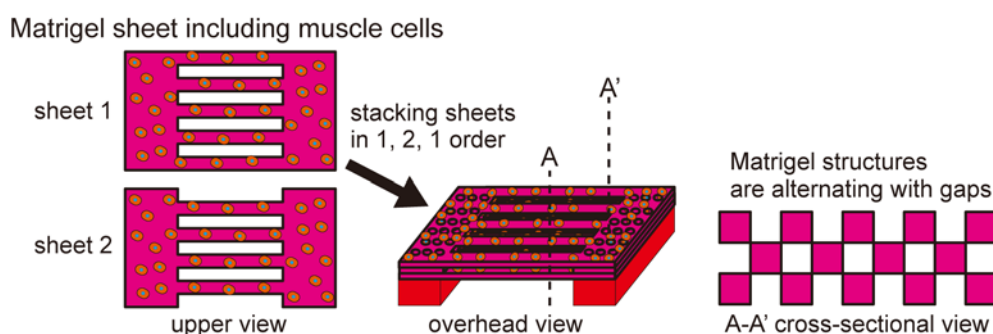


Fig. 2.6 筋芽細胞含有ゲルシートの積層 概念図

骨格筋線維束の3次元培養を行うためには、骨格筋線維端部を固定するための固定部材が必要である。本論文においては、固定部材としてガラスまたは光造形装置で作製した構造の表面にフィブロネクチンを一晚吸着させたものを使用した。このガラスを Fig. 2.5(a) に示した形状のPDMS基板の端部に置くと、骨格筋線維端部が固定される部位がPDMS基板表面より高い位置になる。この位置関係のため、MPCポリマーと同様に骨格筋線維がPDMS表面に接着するのを防ぐことができる (Fig. 2.5(d))。

筋芽細胞を含有したゲル化前のマトリゲルの溶液をPDMS基板上に置き、PDMSスタンプで上から押し付けることでスタンプと基板でマトリゲル溶液を挟んだ (Fig. 2.5(b))。この状態で15分間37°Cで温めて、マトリゲル溶液をゲル化させた。このマトリゲル溶液をゲル化させる際は、水分の蒸発を防ぐために高湿度環境に置いた。これは高湿度環境に置かず乾燥が進んだ場合、筋芽細胞の活性が低くなり後述の骨格筋線維束の多核化過程においてマトリゲル構造が破断してしまったためである。その後PDMSスタンプを外すことで、PDMSスタンプの寸法を転写した細幅マトリゲル構造が筋芽細胞を含んだ状態で構築された (Fig. 2.5(c))。細幅マトリゲル構造内の筋芽細胞を増殖用培地で1日培養し細胞同士の接着を促した後、多核化用培地で培養を行った。培養日数を重ねると徐々に筋芽細胞の多核化が進み、両端が固定部材に固定された骨格筋線維束が構築された。なお、増殖用培地と多核化用培地の構成は付録A.2.1項に記述してある通りに調整した。

2.3.2 筋芽細胞含有ゲルシートの積層

骨格筋線維束の断面積を増大させるため、細幅マトリゲル構造の3次元アレイ化を試みた (Fig. 2.6)。このために、細幅マトリゲル構造が2次元アレイ化された筋芽細胞含有のマトリゲルシートを構築し、このシートを固定部材上に積み重ねていくことで3次元アレイ構造を

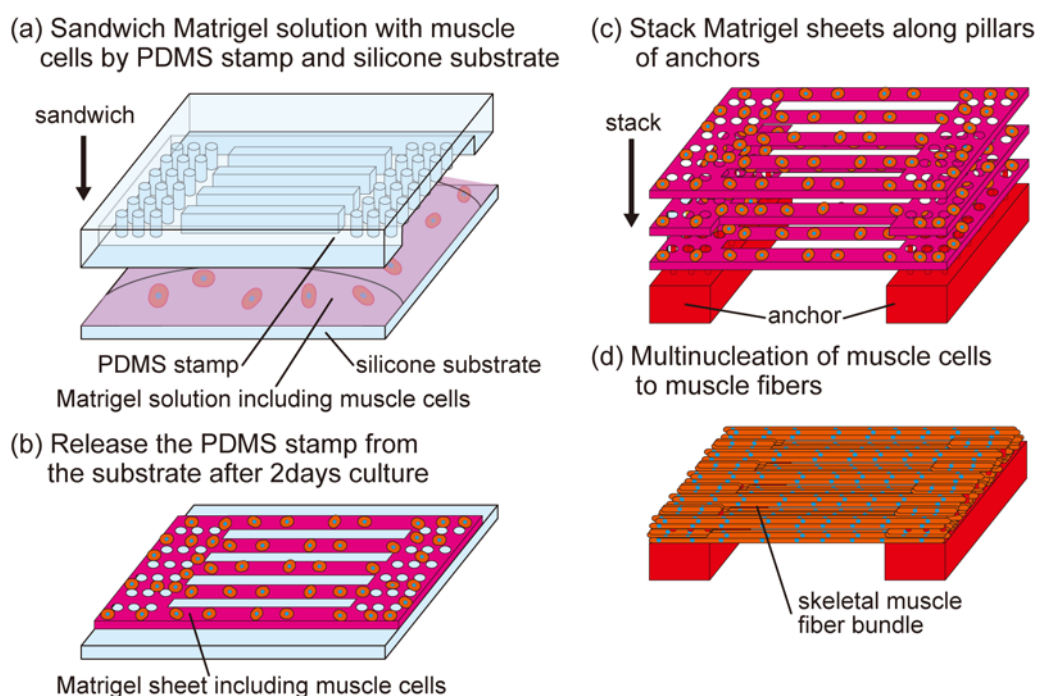


Fig. 2.7 筋芽細胞含有ゲルシートの積層による骨格筋線維束構築方法

実現する。また、2次元アレイ化された筋芽細胞を含むマトリゲルシートの形状を2パターン用意することで、積層時に細幅マトリゲル構造が隣り合わせにならないようにした。

具体的な筋芽細胞含有ゲルシートの積層による骨格筋線維束の構築方法を以降に記述する (Fig. 2.7)。まず、細幅ゲル構造がアレイ化されている部分と、多数の柱が設置されている端部とで構成されている2次元アレイ化用PDMSスタンプを用意した。2次元アレイ化用PDMSスタンプとシリコンゴムシートを使用して筋芽細胞を含むマトリゲル溶液を挟んだ (Fig. 2.7(a))。なお、この2次元アレイ化用PDMSスタンプは2.3.1項と同様の方法で滅菌とMPCポリマー塗布を行った。次に、高湿度環境で15分間37°Cで温めマトリゲル溶液をゲル化した後、PDMSスタンプとゴムシートでマトリゲル構造を挟んだ状態のまま増殖用培地で2日間培養した。培養中に筋芽細胞はお互いに接着し合い強固の構造になるため、PDMSスタンプとゴムシートからマトリゲル構造を外すことで筋芽細胞を含むマトリゲルシートとして扱うことができる (Fig. 2.7(b))。その後、多数の柱が立っている固定部材にマトリゲルシートの端部にある穴を沿わせるように、マトリゲルシートを積み重ねた (Fig. 2.7(c))。この状態で多核化用培地で培養することで筋芽細胞が骨格筋線維に多核化され、端部が柱に巻きついた状態の骨格筋線維束が構築される (Fig. 2.7(d))。また、増殖用培地と多核化用培地の構成は付録

A.2.1 項の通りである。

2.3.3 固定部材付き柔軟電極基板の構築

拮抗筋構造において各々の骨格筋線維束を選択的に駆動するためには、培養液中で特定の骨格筋線維束に独立して電気刺激を与える必要がある。特定の骨格筋線維束にのみ電気刺激を与えるために、固定部材端部に電極が配置されたデバイスを構築し、固定部材上の骨格筋線維束を電気刺激することを考案した。そこで、パリレンシートを用意し、その表面に固定された固定部材の端部に金電極が配置されているデバイスの構築を試みた。固定部材の端部に電極を配設するために、パリレンシートに金電極を含有させることで柔軟電極として扱い、この電極を通じて電気を供給できるようにした。固定部材端部にある金電極以外は絶縁体で覆われているため、培養液中において固定部材端部の金電極しか通電することができない。この通電可能な金電極を通して固定部材に端部を固定された骨格筋に電気刺激を与えることができる。

具体的な固定部材付き柔軟電極基板の構築方法は下記に示す (**Fig. 2. 8**)。まず、ガラス板上にパリレンを成膜し (**Fig. 2. 8(a)**)、その上にクロムと続いて金を蒸着した。金の上にスピコートにより S1818 の薄層を形成した後に、ガラスマスクを通じて紫外光を当て NMD で現像を行うことで S1818 のパターニングを行った (**Fig. 2. 8(b)**)。次に、S1818 によって保護されていない部分の金を王水によって溶かし、クロムを HY によって溶かした。最後に、アセトンによって S1818 を溶かすことによって、金がパターニングされたパリレンが構築された (**Fig. 2. 8(c)**)。ガラス板からパリレンシートを取り外した後に、導電接着剤を用いた導線の接着と生体適合性のある光硬化性樹脂を用いた固定部材の接着を行った (**Fig. 2. 8(d)**)。通電させたい金電極部分の表面にシリコーンゴムを貼り付けた後、デバイス表面に再度パリレンの成膜を行った。シリコーンゴムの下に置かれた金電極のみパリレンが表面に覆われていないため、シリコーンゴムを外すとパリレン非成膜部分とパリレン成膜部分に分けることができた (**Fig. 2. 8(e)**)。パリレンは絶縁体として働くため、パリレン非成膜部分は通電可能でありパリレン成膜部分は通電不可能である。最後に、パリレン非成膜部分の周囲を切り、この部分を固定部材に沿って折り曲げて固定部材との接触面を光硬化性樹脂で固定した (**Fig. 2. 8(f)**)。光硬化性樹脂も絶縁体であるため、固定部材上にある多数の柱の傍にある電極のみ通電可能となっている。

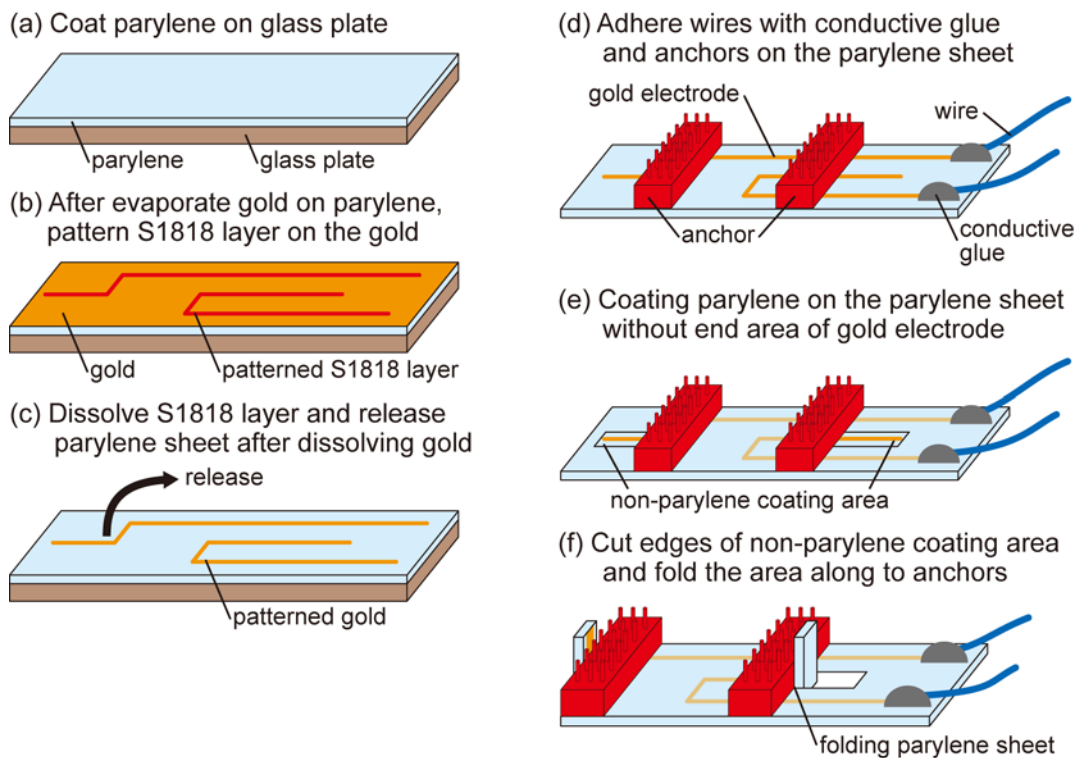


Fig. 2.8 固定部材付き柔軟電極基板の構築方法

2.4 結言

本章では、生体外において構築した骨格筋線維束の収縮力を推定するための物理モデルを骨格筋の力学的特性から提案した。この物理モデルでは、骨格筋線維束の収縮力に骨格筋線維の成熟度と整列が影響を与えることを示した。加えて、物理モデルを様々な条件における収縮に適用することで、収縮速度または収縮量が収縮力に与える影響について示した。最後に、提案する骨格筋線維束の構築方法と培養液中にて選択的に骨格筋線維束に電気刺激供給するための固定部材付き柔軟電極基板の作製方法について述べた。

第 3 章 骨格筋線維束の構築と特性評価

3.1 緒言

細幅マトリゲル構造から骨格筋線維束を構築し，ゲル構造の寸法と骨格筋線維束の特性の関係を明らかにすることで，第 2 章で提案した物理モデルの妥当性を検証する．また，ゲルシートの積層により，細幅マトリゲル構造を 3 次元アレイ化した状態で骨格筋線維束を構築し，その骨格筋線維束の収縮力特性について検証する．さらに，ゲルシートの積層により骨格筋線維束を固定部材付き柔軟電極基板上に配置して，柔軟電極を介して骨格筋線維束に電気刺激を供給可能か評価すると共に，固定部材付き柔軟電極基板上での骨格筋線維束の培養が，骨格筋線維束の収縮力特性に影響を与えないことを確認する．

3.2 骨格筋線維束の特性とゲル構造寸法との関係

3.2.1 骨格筋線維束の形状と構造

幅と高さがそれぞれ 500 μm ，750 μm ，1000 μm の PDMS スタンプと基板を用いて型取られた筋芽細胞含有の細幅マトリゲル構造と，それらの培養後の様子を **Fig. 3.1** に示す．なお，特に言及がない場合は本節において使用する筋芽細胞は C2C12 であるとする．細幅マトリゲル構造の写真から，PDMS スタンプの形状に応じてマトリゲル構造の寸法を変化できていることが分かる．PDMS スタンプによるマトリゲル構造の転写性の評価のために，マトリゲル構造の幅と PDMS スタンプの幅を比較したものを **Fig. 3.2(a)** に示す．この比較により，平均誤差 10 μm 以内・標準偏差 17 μm 程度の正確性で PDMS スタンプの形状をマトリゲルに転写で

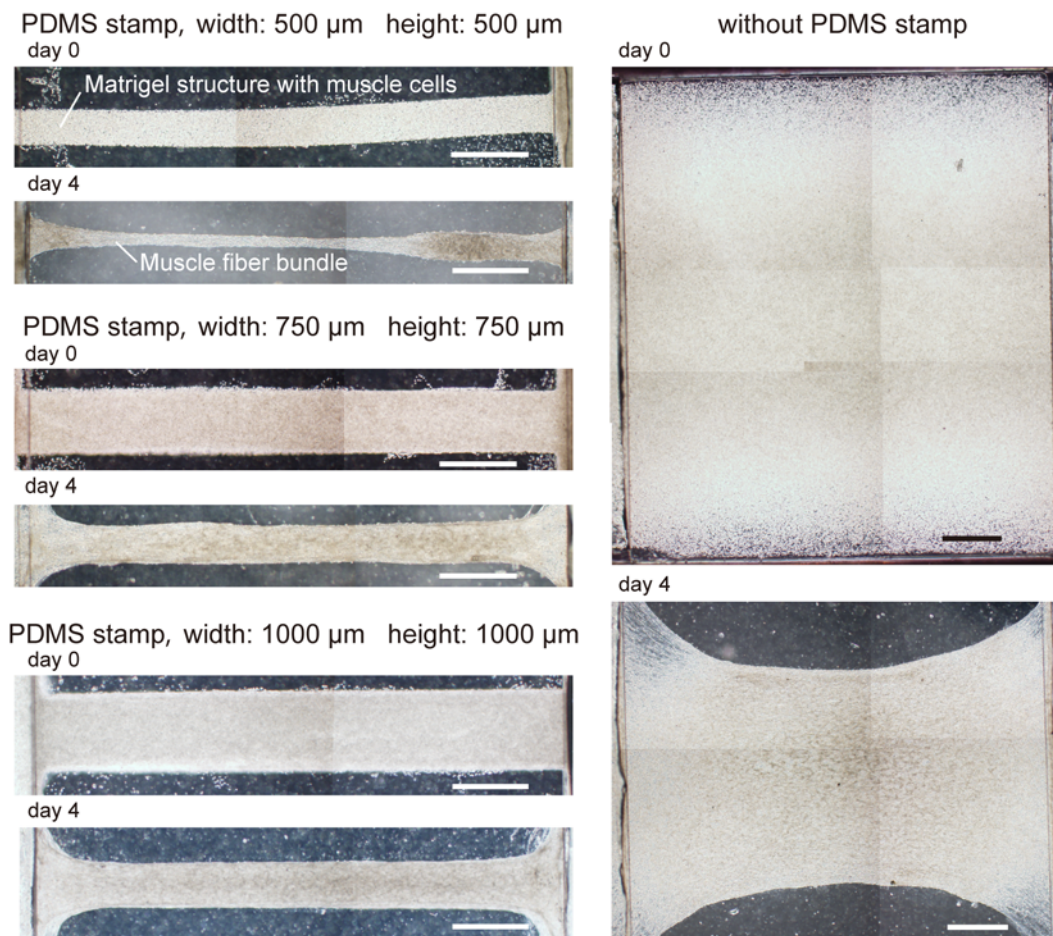


Fig. 3.1 筋芽細胞含有マトリゲル構造 (培養 0 日) と骨格筋線維束 (培養 4 日後) の様子 (スケールバー 1 mm) (©2013 Elsevier)

きており、幅 500 μm 、750 μm 、1000 μm といった差は十分に表現できることが分かる。また、マトリゲル構造内の細胞分布を調べるため、幅と高さが 500 μm の PDMS スタンプを用いて作製されたマトリゲル構造を用いて、500 $\mu\text{m} \times 500 \mu\text{m}$ の範囲内に含まれる細胞数をマトリゲル構造の中心部と両端部において比較した (Fig. 3.2(b))。本結果より、マトリゲル構造の中心部と両端部における細胞密度はほぼ等しく、マトリゲル構造中に均一に細胞が分布されていることが示唆された。

作製された細幅マトリゲル構造内の筋芽細胞において培養前後の状態を比較すると、本培養方法により筋芽細胞の多核化が進み、培養後に骨格筋線維束が構築されていることが分かる (Fig. 3.1)。この時、培養前のマトリゲル構造の幅と培養後の最細部分の幅を比較すると、

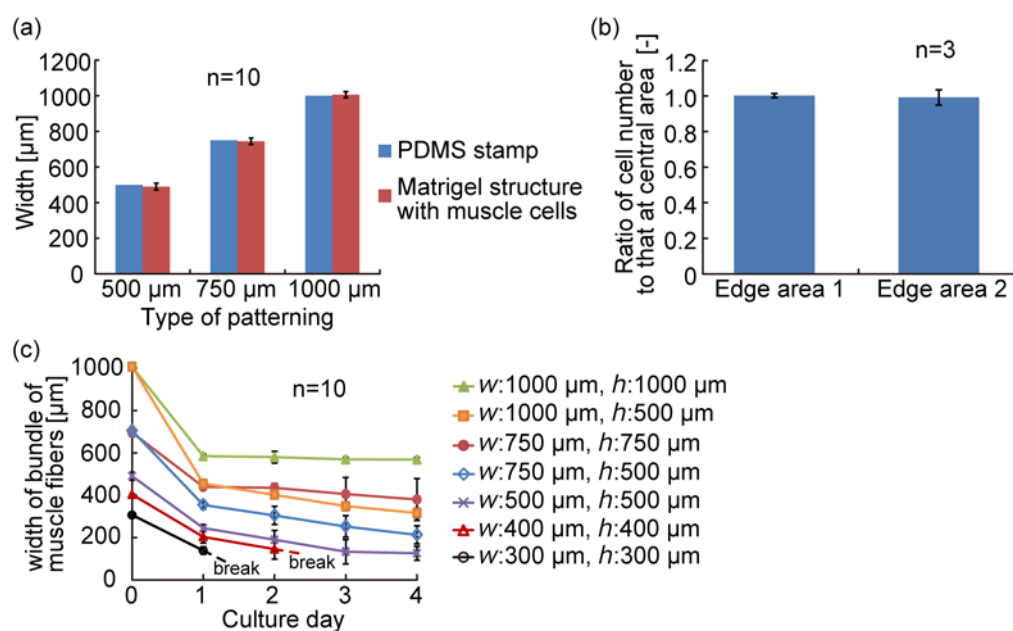


Fig. 3.2 (a) PDMS スタンプ寸法とマトリゲル構造寸法の関係 (b) マトリゲル構造の中心部と両端部における細胞分布の比較 (c) 培養日数に応じた骨格筋線維束の最細部幅と PDMS スタンプ寸法の関係 (w はスタンプ幅, h はスタンプ高さを表す)

幅は培養日数に応じて徐々に細くなっていった (Fig. 3.2(c)). また, PDMS 寸法が幅と高さとともに $500\ \mu\text{m}$ 以下の時に培養中に骨格筋線維束が途中で必ず破断してしまうことも観察された. 幅の減少は多核化によって細胞同士が密集することにより骨格筋線維束の幅が徐々に狭まっていったためであり, PDMS 寸法が小さい時は構築される骨格筋線維本数が少なく外乱によって破断したと考えられる. また, 培養 0 日の時の骨格筋線維束の幅を 100% として, 培養 4 日後の骨格筋線維束の幅の変化率を評価すると, マトリゲル構造の高さと幅が $1000\ \mu\text{m}$ の時は約 57%, $750\ \mu\text{m}$ の時は約 54%, $500\ \mu\text{m}$ の時は約 25% となった. この結果より, 培養前のマトリゲル構造の幅が細くなるにつれて, 培養後の骨格筋線維束の幅が大きく変化することが分かった. 多核化により筋芽細胞間の距離が縮まることを考慮すると, マトリゲル構造の寸法に応じて多核化の進行度合いが異なることが示唆される. マトリゲル構造の寸法が骨格筋線維束の各種特性に与える影響については, 3.2.2 項から 3.2.5 項までに実験結果と共に述べる.

本方法で作製された骨格筋線維束が, 筋小胞体から放出されたカルシウムイオンにより収縮が発生できる構造になっているかを評価した. 筋小胞体は電気刺激により活性化しカルシ

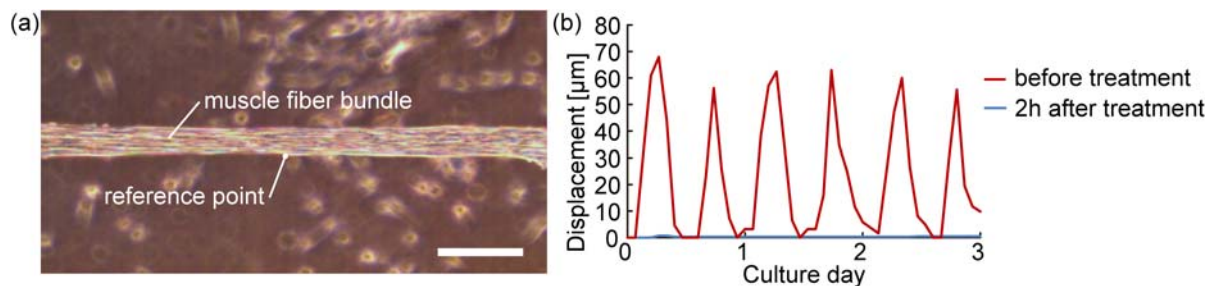


Fig. 3.3 (a) 刺激前の骨格筋線維束の様子 (スケールバー :500 μm) (b) ニカルジピン塩酸塩処理前後における電気刺激に対する参照点の移動量 (電場 2.5 V/mm, 時間 20 ms, 間隔 2 Hz)

ウムイオンを放出するため、骨格筋線維束の両端部付近に金電極を配置して電気刺激を与えた際の収縮特性を評価した。また、筋小胞体のカルシウムチャンネルはニカルジピン塩酸塩により無効化することができるため^{[99]-[101]}、ニカルジピン塩酸塩 (5 μM) を培養液中に添加してから 2 時間後の収縮特性を合わせて評価した。なお、ニカルジピン塩酸塩は水に難溶な物質なため、ニカルジピン塩酸塩 (10 mM) をジメチルスルホキシドに溶かした溶液を用意し、適量添加することでニカルジピン塩酸塩を培養液に溶かした。Fig. 3.3(a) に表す参照点の移動距離の計測によるニカルジピン塩酸塩処理前後における骨格筋線維束の収縮特性の比較結果を Fig. 3.3(b) に示す。電気刺激により収縮が発生しニカルジピン塩酸塩により収縮が停止することから、作製された骨格筋線維束は筋小胞体からのカルシウムイオン放出により収縮していると考えられる。

さらに、作製された骨格筋線維が生体同様にサルコメア構造を有しているかを評価した。サルコメア構造があると Z 膜が縞状模様に構築され、Z 膜には α-アクチニンが分布していることが知られている^{[41], [57]}。そこで、サルコメア構造の有無を α-アクチニンが縞状に分布していることで確認するため、α-アクチニン抗体を使用して免疫染色を行った。なお、免疫染色の方法は付録第 C.1 節のとおりであり、電気刺激 (電場 2.5 V/mm, 時間 20 ms, 間隔 2 Hz) を 10 分間かけた後に一晩培養してから行った。骨格筋線維束を免疫染色した結果を Fig. 3.4 に示す。α-アクチニンが縞状の模様になっていることから、サルコメア構造を骨格筋線維が有していると考えられる。以上の結果より、筋小胞体と共にサルコメア構造も有していることが示唆されているため、作製された骨格筋線維束は生体に近いものになっていると考えられる。

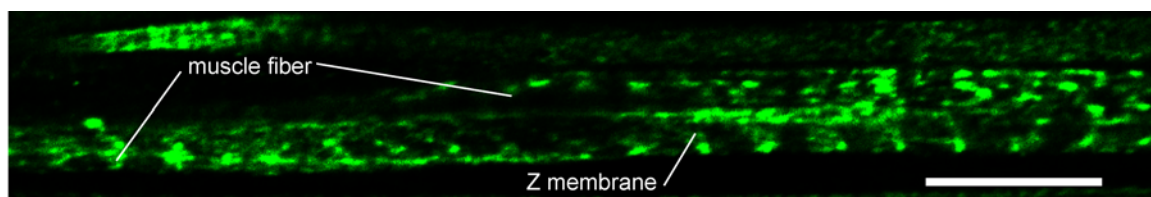


Fig. 3.4 ゲル構造のパターニングにより構築された骨格筋線維束における α -アクチニン (緑) の免疫染色画像 (スケールバー 10 μm)

3.2.2 骨格筋線維の長さ

骨格筋線維束中において骨格筋線維がどのような長さで構築されているかを評価した。

測定方法概要

骨格筋線維束中における骨格筋線維の長さを計測するために、DiI による細胞膜の染色法 [102] を用いて、骨格筋線維の細胞膜を染色した。まず、構築した骨格筋線維束を 4% パラホルムアルデヒドに 1 時間浸けて固定化した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶かした 1% アガロース溶液に浸けた。4°C 環境下に一晚おいてアガロースをゲル化させることにより、骨格筋線維束をアガロースゲルに包埋した。次に、骨格筋線維束の中心をアガロースゲルごとナイフで切断し、骨格筋線維束の切断面に DiI 粉末を付着させた。その後、カビの発生を防ぐために、アガロースゲルに包埋された骨格筋線維束を DiI 粉末が付着したまま 4% パラホルムアルデヒド溶液に入れた。この状態で、室温で 3ヶ月放置した。この間、DiI は疎水性の蛍光物質であるので、細胞膜の脂質部分に徐々に溶け込んでいき、切断面に存在する骨格筋線維の細胞膜のみが染まっていく。なお、DiI 染色中 4% パラホルムアルデヒドが乾燥で蒸発するのに応じて、適宜 4% パラホルムアルデヒドの追加を行った。

測定結果

PDMS スタンプ寸法が幅と高さともに 500 μm , 1000 μm の時に作製された骨格筋線維束と、PDMS スタンプを用いていない場合の骨格筋線維束を用意し、各条件の骨格筋線維束中の骨格筋線維の細胞膜を染色した (Fig. 3.5(a))。この結果より、PDMS 寸法によって骨格筋線維の長さを変化していることが分かる。各条件における骨格筋線維長の差を定量的に評価するため、骨格筋線維束の幅方向に沿って 500 μm 毎を一つの領域として切り取り、その領域内で筋線維束の長軸方向に最も伸びている骨格筋線維長を計測した (Fig. 3.6)。Fig. 3.6 における ** は $P < 0.01$ を表しており、本統計処理では F 検定にて分散性を評価し、それに応じた t 検定

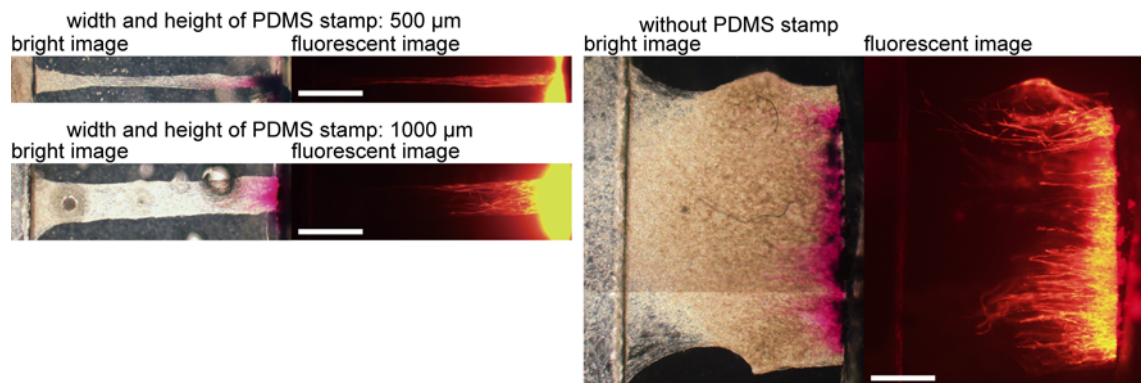


Fig. 3.5 細胞膜染色後の骨格筋線維束 (赤: 染色された骨格筋線維, スケールバー: 1 mm) (©2013 Elsevier)

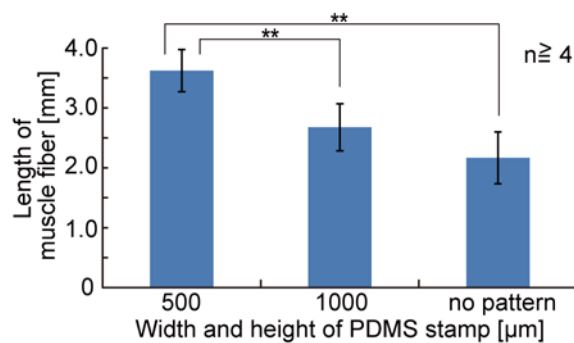


Fig. 3.6 骨格筋線維束内の骨格筋線維の長さ と PDMS スタンプ寸法 の関係 (©2013 Elsevier)

を行った. 計測された骨格筋線維長は PDMS スタンプ寸法が 500 μm の時は平均 3.5 mm, 1000 μm の時平均 2.7 mm は, PDMS スタンプ未使用時は平均 2.2 mm であった. 作製した骨格筋線維束長は 7 mm であるため, スタンプ寸法が 500 μm の時は両端を繋ぐような骨格筋線維が存在しているが, スタンプ寸法が大きくなっていくにつれて骨格筋線維長が短くなり両端を繋ぐ骨格筋線維が存在しなくなることが分かる. 以上のように, 筋芽細胞を含有したマトリゲル構造の寸法は骨格筋線維束中の骨格筋線維の長さに影響があることが分かる.

3.2.3 骨格筋線維の成熟度

2.2.1 項より, 体外で構築された骨格筋線維束の収縮力は成熟度に比例することが予想されている. そこで成熟度の指針として, 骨格筋線維が構築された時に発現するミオゲニン

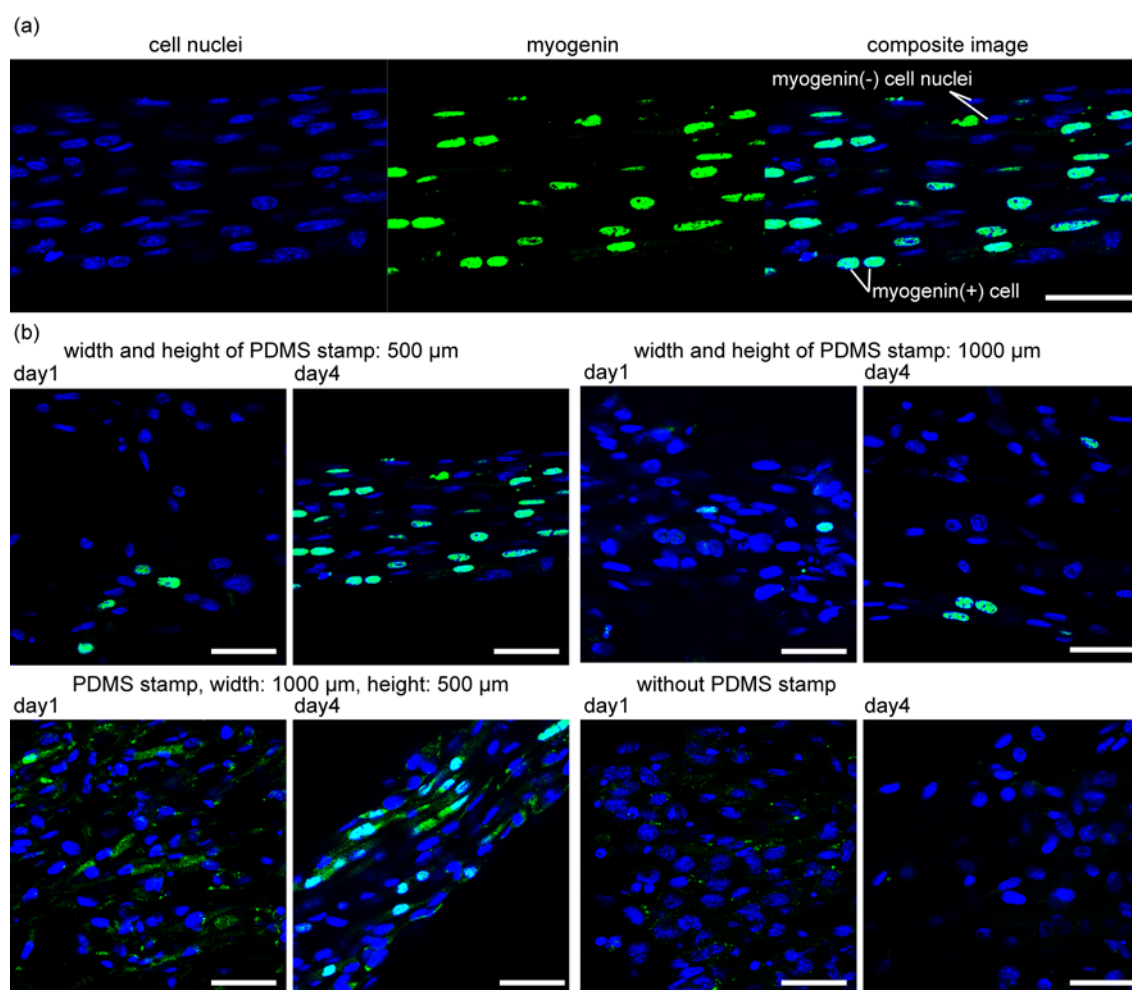


Fig. 3.7 細胞核 (青) とミオゲニン (緑) の免疫染色画像 (a) 同一筋線維の細胞核の染色画像, ミオゲニンの染色画像, 合成画像 (b) PDMS スタンプ寸法と培養日数の関係 (スケールバー: 50 μm)

(myogenin)が存在している細胞核の割合の計測を試みた. ミオゲニンは骨格筋線維の分化マーカーであり, 筋芽細胞から骨格筋線維への多核化が終了した時に発現することが知られている [43]. そのため, ミオゲニンが存在している細胞核の割合は, 成熟度と同義であると考えた. 骨格筋線維の細胞核とミオゲニンはそれぞれ Hoechst33342 とミオゲニン抗体を使用し蛍光染色して観察可能な状態にした. 蛍光染色の方法は付録第 C.1 節のとおりである.

PDMS スタンプ寸法が幅と高さともに 500 μm , 1000 μm の時に作製された骨格筋線維束と, PDMS スタンプ寸法が幅 1000 μm , 高さ 500 μm の時に作製された骨格筋線維束と, PDMS スタンプを用いていない場合の骨格筋線維束を用意した後, 細胞核とミオゲニンを蛍光染色し

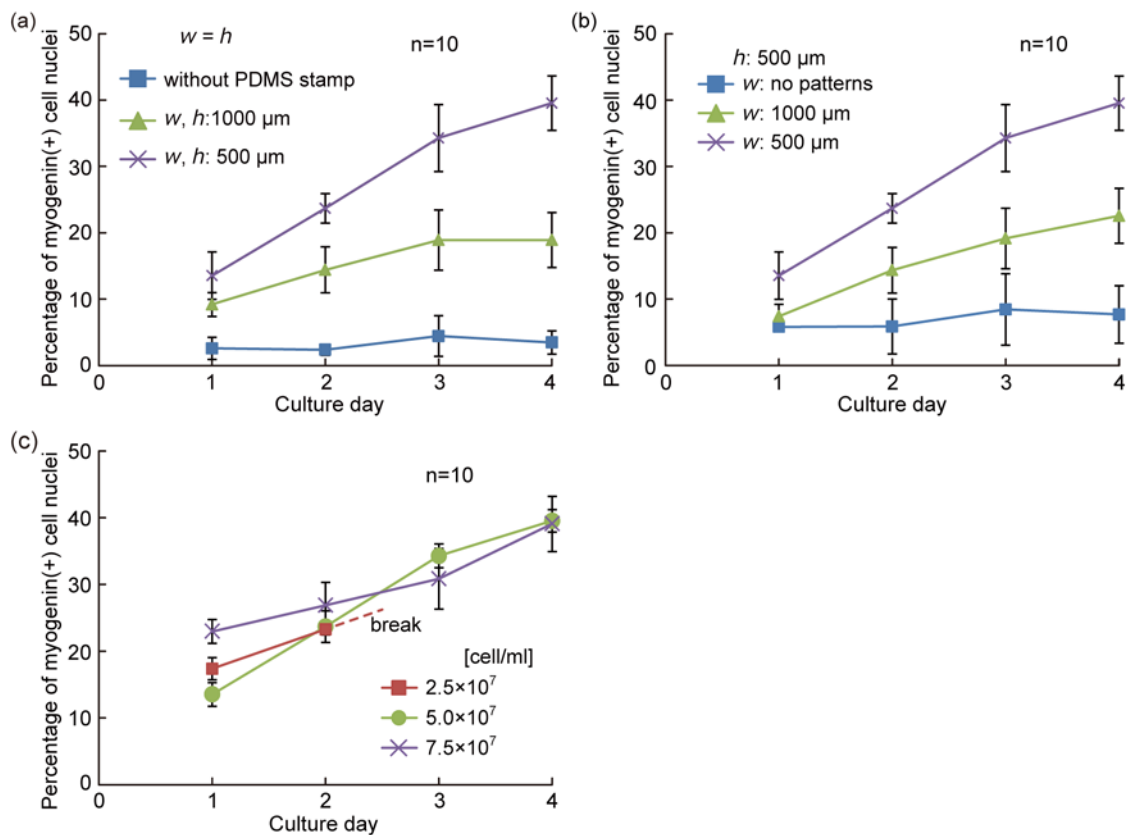


Fig. 3. 8 ミオゲニン発現割合と培養日数の関係 (a) PDMS スタンプの幅と高さと同じ時 (b)PDMS スタンプ高さ $500 \mu\text{m}$ の時 (c)PDMS スタンプ幅と高さ $500 \mu\text{m}$ で細胞濃度変えた時 (©2013 Elsevier)

共焦点顕微鏡で観察した様子を **Fig. 3. 7** に示す。ミオゲニンが発現している細胞核が染色され、ミオゲニンが発現している細胞核が区別できることが分かる。さらに、培養するにつれてミオゲニンが発現している細胞核の割合が増加していることと、PDMS スタンプの寸法によってミオゲニンが発現している細胞核の割合が変化することが確認された。定量的にミオゲニンの発現している細胞核の割合と PDMS スタンプの寸法を比較すると、スタンプの幅・高さが小さくなればなるほどミオゲニンの発現割合が増加することが分かる (**Fig. 3. 8(a)**)。また **Fig. 3. 8(a)** と **Fig. 3. 8(b)** の比較より、高さだけの变化では大きくミオゲニンの発現割合が変わることなく、幅と高さともに小さくすることがミオゲニンの発現割合を向上させることが必要であることが分かる。さらに、高さ・幅ともに $500 \mu\text{m}$ のスタンプを用いて、マトリゲル溶液に含有させる筋芽細胞濃度とミオゲニンの発現割合を比較した結果は **Fig. 3. 8(c)** であ

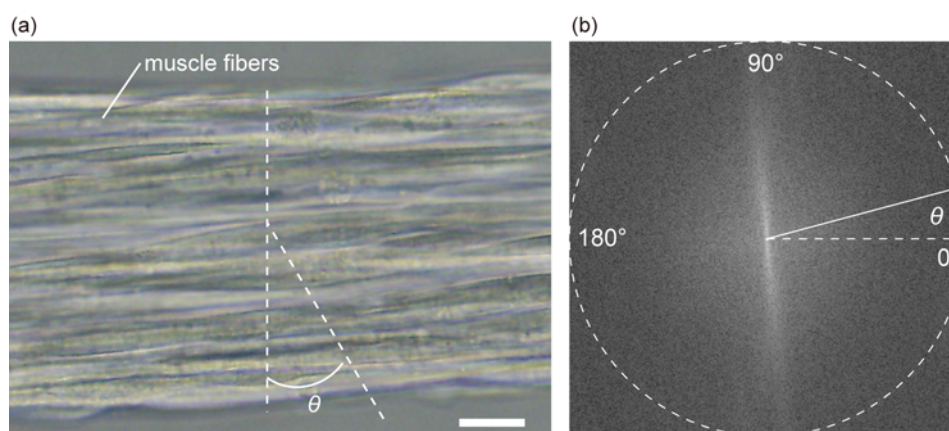


Fig. 3.9 (a) 骨格筋線維束の拡大図 (スケールバー 20 μm) **(b)** 骨格筋線維束の FFT 図 (©2013 Elsevier)

る. この結果は筋芽細胞濃度はミオゲニンの発現割合に大きく影響しないことが示唆している. 以上より, 骨格筋線維の成熟度を増加させるためには, PDMS スタンプを用いて幅・高さともに小さい筋芽細胞含有マトリゲル構造を構築することが重要であることが分かる.

3.2.4 骨格筋線維束の配向性

2.2.1 項より, 体外で構築された骨格筋線維束収縮力は筋線維長軸方向の存在確率分布に依存していることが予想されている. そこで骨格筋線維束中の骨格筋線維の配向性の評価を試みた.

測定方法概要

骨格筋線維束中における骨格筋線維の配向性を評価するために, 高速フーリエ変換 (Fast Fourier Transform, FFT) による画像解析を用いた. FFT を用いた配向性の評価は, 細胞からゲル繊維まで幅広い材料を対象として使用されている方法である [56], [103], [104]. 本論文では, まず骨格筋線維束の画像を用意して (**Fig. 3.9(a)**), 正方形の領域においてハニング窓画像との重ね合わせ画像を ImageJ を利用して作製した. この重ね合わせ画像の FFT 図はグレイスケールの画像となっており, 画像の輝度値の変化を周波数として出力されている (**Fig. 3.9(b)**). そのため, FFT 図における画像中心からの直線方向に沿った輝度値の合計は, その方向における骨格筋線維の存在確率の高さを示している. 骨格筋線維の方向分布を定量的に評価するために, 各角度に対する画像中心からの直線方向に沿った輝度値の合計を平均 1 になるように標準化した後に, 配向性 S を求めた. $A(x)$ は FFT 図の中心部から端部までの半径方向に沿った

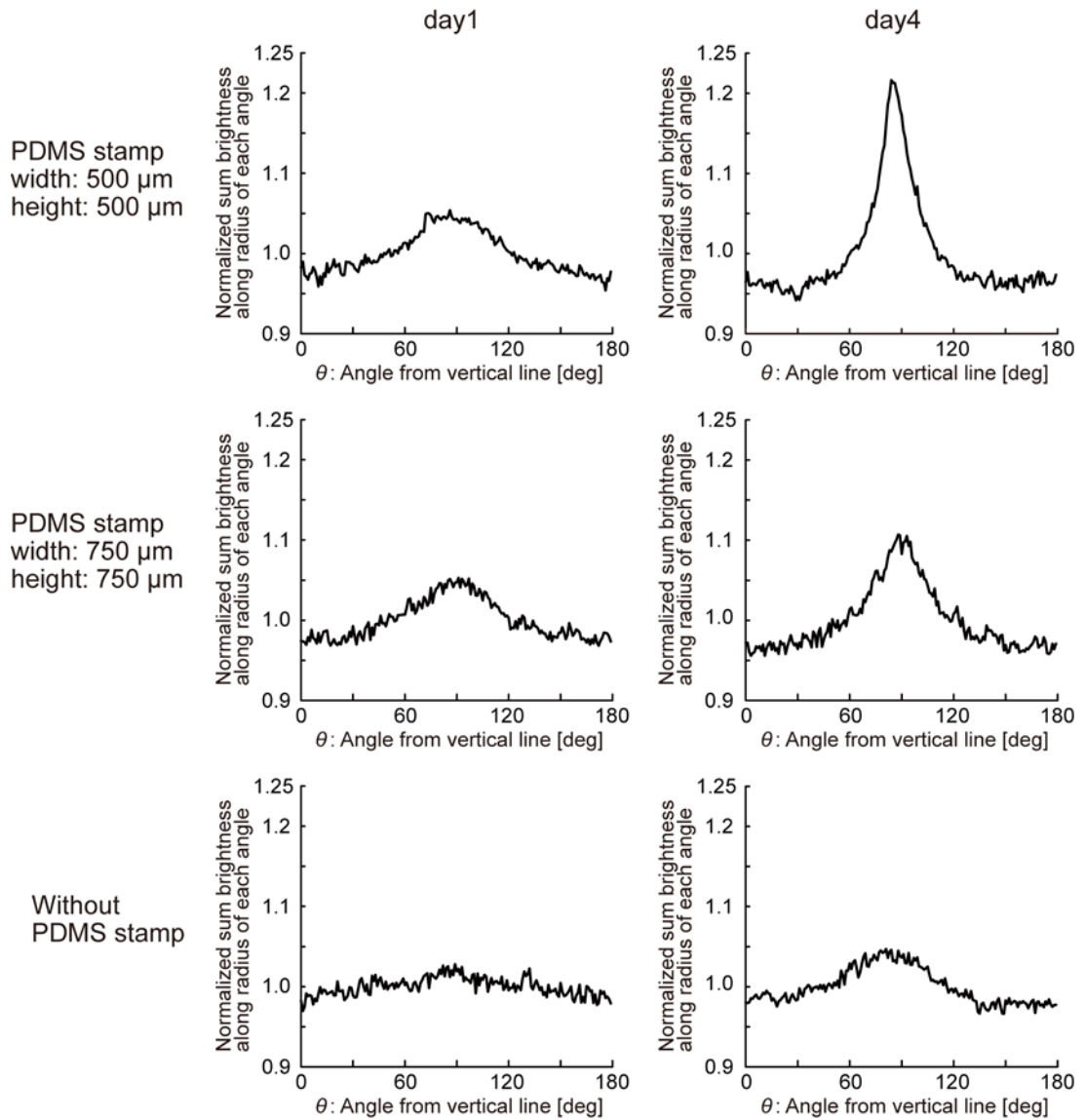


Fig. 3.10 各種条件における骨格筋線維束中の骨格筋線維の方向分布

輝度合計の標準化された大きさ, i は角度を表す指標, M はその指標の最大数, A_{\max} は輝度合計の標準化された大きさ A の最大値を表すとすると, 配向性 S は,

$$S = \frac{\frac{1}{M} \sum_{i=0}^{M-1} A\left(\frac{i\pi}{M}\right)}{A_{\max}} \quad (3.1)$$

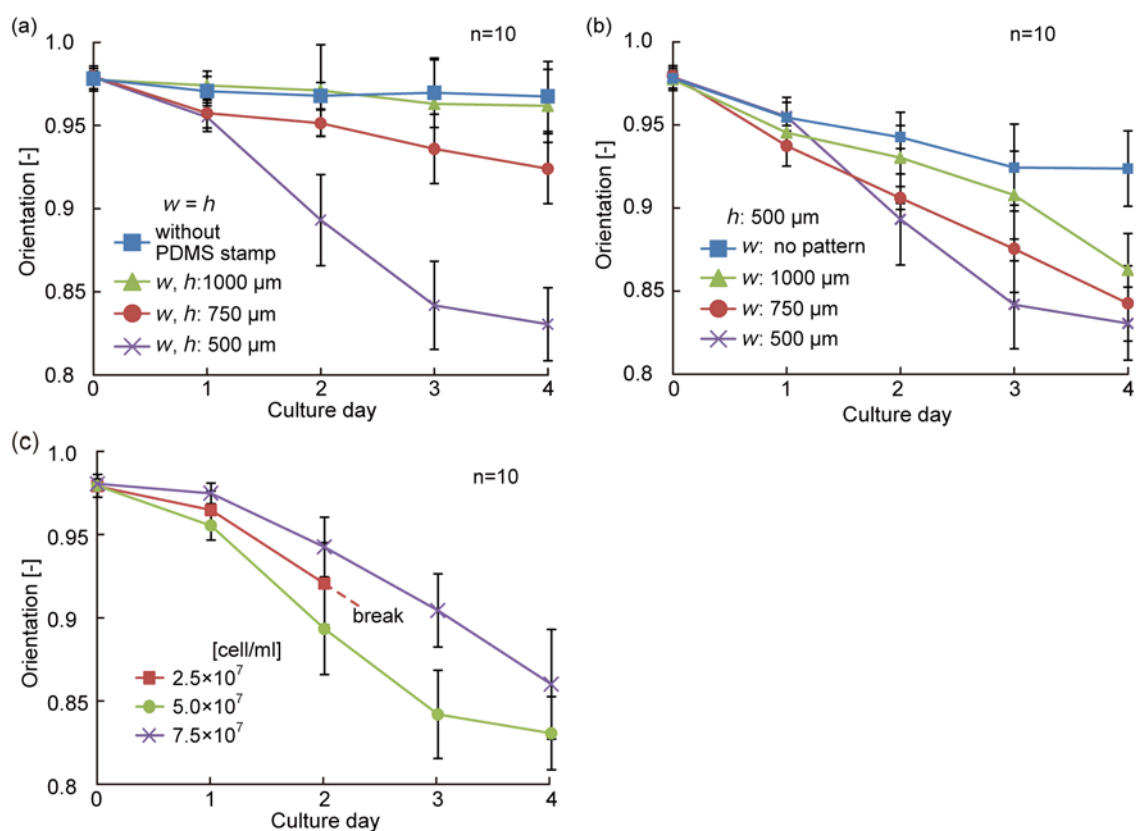


Fig. 3.11 配向性と培養日数の関係 (a) PDMS スタンプの幅と高さが同じ時 (b) PDMS スタンプの幅 $500\ \mu\text{m}$ の時 (c) PDMS スタンプ幅と高さ $500\ \mu\text{m}$ で細胞濃度変えた時 (©2013 Elsevier)

であると定義される^{[103],[104]}. 配向性 S は完全に一方向に沿って並んでいる場合 0 となり, 完全等方性を有している場合 1 となる.

測定結果

PDMS スタンプ寸法が幅と高さともに $500\ \mu\text{m}$, $750\ \mu\text{m}$ の時に作製された骨格筋線維束と, PDMS スタンプを用いていない場合の骨格筋線維束から, 標準化された骨格筋線維方向分布を FFT を用いて評価した結果を **Fig. 3.10** に示す. **Fig. 3.10** において 90° が骨格筋線維束の長軸方向を示しているので, 培養日数が増加するにつれて骨格筋線維が骨格筋線維束の長軸方向に並行に整列することが分かる. また, その骨格筋線維束の長軸方向への整列は, PDMS スタンプの寸法が小さくなると促進されることが分かる. 式 (3.1) を用いて配向性を評価し, PDMS スタンプの寸法との関係を表した結果を **Fig. 3.11** に示す. スタンプの幅・高さが小さくなればなるほど配向性が改善することが分かる (**Fig. 3.11(a)**). また **Fig. 3.11(a)** と **Fig. 3.**

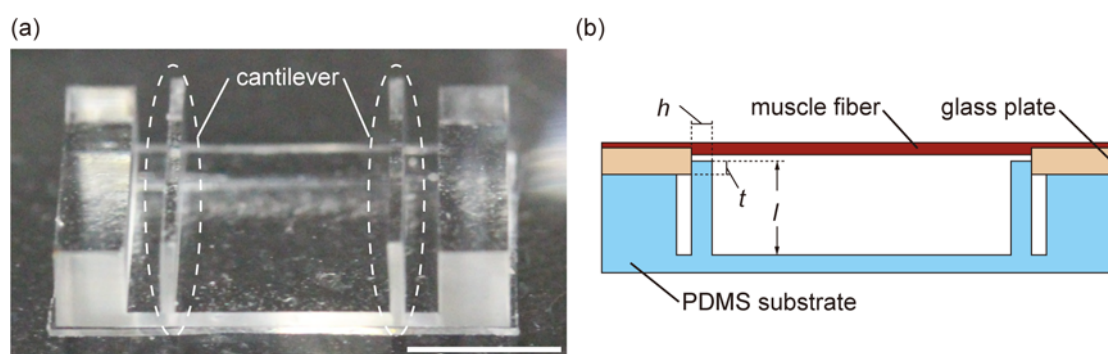


Fig. 3.12 (a) 片持ち梁を有する PDMS デバイス (スケールバー :2 mm) (b) 片持ち梁を有する PDMS デバイスへの骨格筋線維束の配置 概念図 (©2013 Elsevier)

11(b) の比較より，ミオゲニンの発現割合とは異なり，高さだけの变化でも一定程度配向性は改善されることが分かる．さらに，高さ・幅ともに $500\ \mu\text{m}$ のスタンプを用いて，マトリゲル溶液に含有させる筋芽細胞濃度と骨格筋線維の配向性を比較した結果は Fig. 3.11(c) である．この結果はミオゲニンの発現割合と同様に，筋芽細胞濃度は配向性に大きく影響しないことが示唆されている．以上より，骨格筋線維束中における骨格筋線維の配向性を改善させるためには，幅と高さがともに配向性に影響を与えることを考慮し，寸法ができるだけ小さい筋芽細胞含有マトリゲル構造を構築することが重要であることが分かる．

3.2.5 骨格筋線維束の収縮力

骨格筋線維束の長さ変化による収縮力への影響を除外するため，等尺収縮を用いて最大能動的張力を計測し，構築された骨格筋線維束の収縮力の評価を行った．

測定方法概要

等尺収縮を引き起こして骨格筋線維束の最大能動的張力を計測するため，片持ち梁を有している PDMS デバイスを用意した (Fig. 3.12(a))．骨格筋線維束の端部にあるガラス板を片持ち梁で支えるように配置すると (Fig. 3.12(b))，この片持ち梁は骨格筋線維束の収縮力に応じて微小変形を起こす．この PDMS デバイスを使用した場合，骨格筋線維束の収縮力は片持ち梁の抗力と慣性力，摩擦力，粘性抗力の合計値と釣り合う．しかし，今回の実験系においては，加速度が約 $0.038\ \text{m}/\text{sec}^2$ であったため慣性力は $0.5\ \mu\text{N}$ 以下であると推察され，静止摩擦係数が約 0.18 であったため摩擦力は $1\ \mu\text{N}$ 以下であると推察され，抗力係数が約 1667 であったため粘性抗力は $0.02\ \mu\text{N}$ 以下であると推察される．つまり，慣性力と摩擦力，粘性抗力は

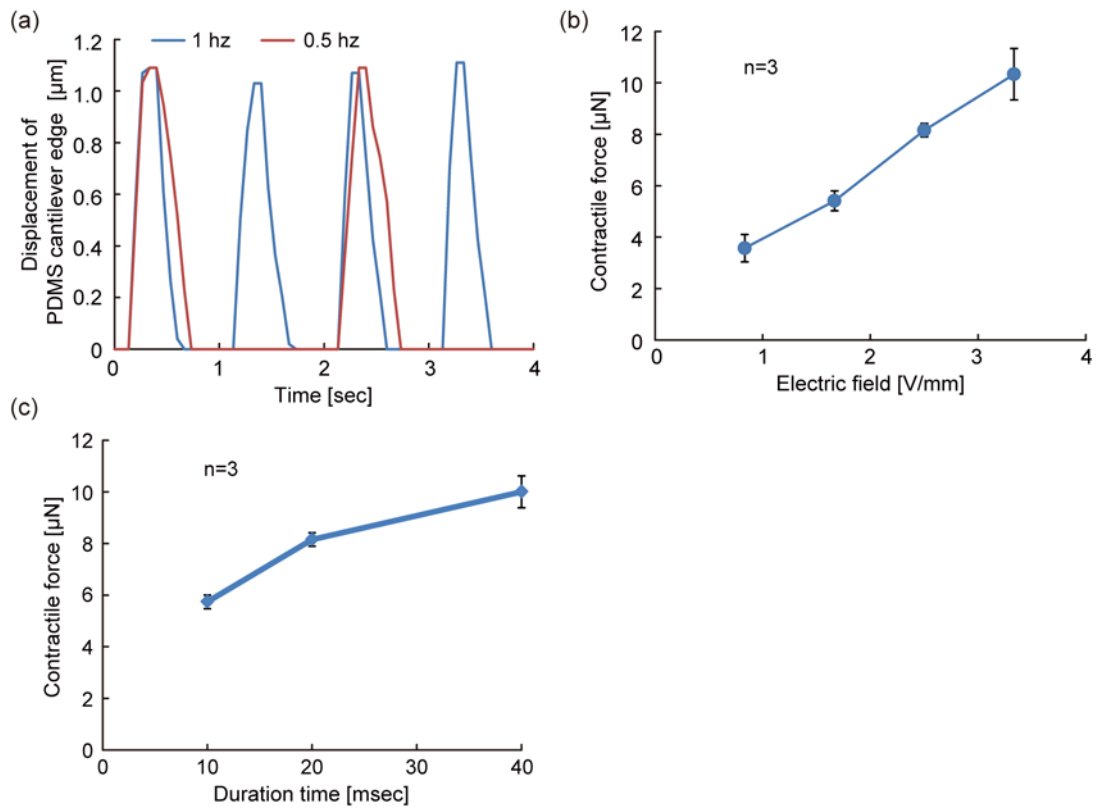


Fig. 3.13 電気刺激と骨格筋線維束の収縮特性の関係 (a) 電気刺激周波数と収縮頻度 (b) 電気刺激の電場と収縮力 (c) 電気刺激の持続時間と収縮力 (©2013 Elsevier)

全て $1 \mu\text{N}$ 以下であり、無視できるほど小さいと考えることができる。そのため、骨格筋線維束の収縮力は片持ち梁の抗力との静的な力の釣り合いから推定することができる。

以上より、本デバイスを用いて等尺収縮を引き起こした場合（変位が小さくなるように PDMS 片持ち梁を硬くした場合）、式（非公開）のように骨格筋線維束の最大能動的張力は片持ち梁のたわみにより発生する抗力と釣り合うため、

$$\alpha F_{a0} \approx \frac{2 \delta E t w h^3}{3 l^4 - 4 l (1-t)^3 + (1-t)^4} \quad (3.2)$$

という関係で表される。ここで、 δ は PDMS 片持ち梁のたわみを、 E は PDMS のヤング率を、 t はガラス板と片持ち梁の接触部の長さ、 w は片持ち梁の奥行、 h は片持ち梁の高さ、 l は片持ち梁の長さを示している。式 (3.2) の導出は付録第 B.2 節に記載する。なお、使用した PDMS 片持ち梁の物性値は付録第 D.2 節に記載の通りである。

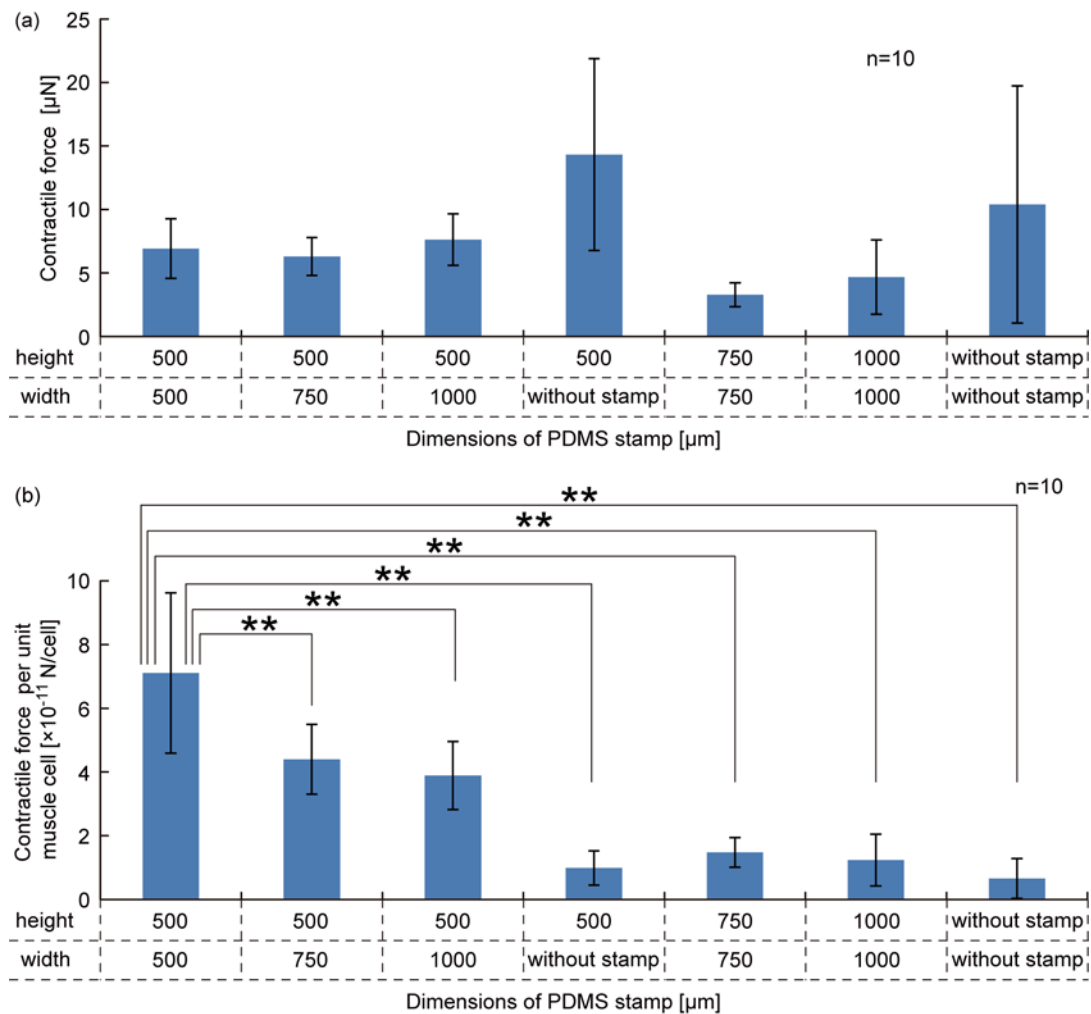


Fig. 3.14 (a) 骨格筋線維束の収縮力と PDMS スタンプ寸法の関係 (b) 骨格筋線維束の単位筋芽細胞当たりの収縮力と PDMS スタンプ寸法の関係 (©2013 Elsevier)

測定結果

金ワイヤを骨格筋線維束の両端に配置し、電気刺激を骨格筋線維束へ与えた。なお、本論文では電気刺激はファンクションジェネレータとアンプを用いて制御し、記載される電気刺激の強さはアンプから出力される電気刺激を表す。2.5 V/mm (30 V を 12 mm 間隔で負荷) かつ 20 ms の電気刺激時の PDMS 片持ち梁の撓みから骨格筋線維束の最大能動的張力を計測した。まず、幅と高さが 500 μm の PDMS スタンプを用いて作製した骨格筋線維束を使用し、電気刺激への応答性を調べた。その結果、骨格筋線維束の収縮は電気刺激と同調して発生しており、PDMS 片持ち梁の端部がそれに応じて変形することが分かった (Fig. 3.13(a))。さらに、

この片持ち梁の変形を用いて骨格筋線維束の収縮力を計測したところ、与える電気刺激の電場と持続時間に応じてほぼ線形に増加することが分かった (**Fig. 3. 13(b, c)**)。電気刺激に収縮が同調する、かつ電場の大きさと刺激の持続時間に対して線形に収縮力が増加するという特性は、従来の体外で構築された骨格筋線維束の特性と等しく^[16]、提案の細幅マトリゲル構造内での筋芽細胞培養は骨格筋線維束の構築に適していることが示唆される。

次に PDMS スタンプの形状を変化させて、骨格筋線維束の構築に用いる筋芽細胞含有マトリゲル構造の寸法を調整することで、収縮力とマトリゲル構造の寸法の間関係を調べた。 **Fig. 3. 14(a)** に骨格筋線維束の収縮力と作製に使用した PDMS スタンプの寸法の間関係を示す。ただし本結果は、 **Fig. 3. 1** に示したように骨格筋線維束の寸法は PDMS スタンプの寸法に応じて培養中に変わってしまうため、骨格筋線維束の収縮特性を表してはいない。そこで骨格筋線維束の収縮特性を示すため、各条件の骨格筋線維束の構築に用いた筋芽細胞濃度とマトリゲル溶液容量から推定した単位細胞数当たりの骨格筋線維束収縮力と PDMS スタンプ寸法との間関係を **Fig. 3. 14(b)** に示す。 **Fig. 3. 14(b)** における ** は $P < 0.01$ を表しており、本統計処理では F 検定にて分散性を評価し、それに応じた t 検定を行った。この結果より、PDMS スタンプの幅と高さともに小さければ小さいほど骨格筋線維束の収縮力が増加することが分かる。以上より、骨格筋線維束の収縮力は PDMS スタンプ寸法を小さくすることで増加するわけではないが、骨格筋線維束の収縮力特性は PDMS スタンプを用いて幅と高さがともに小さなマトリゲル構造体中で培養することで改善することが分かった。

3.2.6 収縮力モデルとの比較

本部分においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内) に出版予定) が予定されるため、非公開とする

3.3 ゲルシート積層により作製された骨格筋線維束の特性

3.3.1 ゲルシート積層による骨格筋線維束の構築

筋芽細胞含有の細幅マトリゲル構造を 3 次元アレイ化して、作製される骨格筋線維束の断面積を増大させるため、筋芽細胞含有のマトリゲルシートの積層による骨格筋線維束の構築を試みた。なお、本論文にて本節以降使用する特筆がない限り筋芽細胞は、初代筋芽細胞であるとする。骨格筋線維束の構築にあたり、まず PDMS スタンプを用いて筋芽細胞含有の細

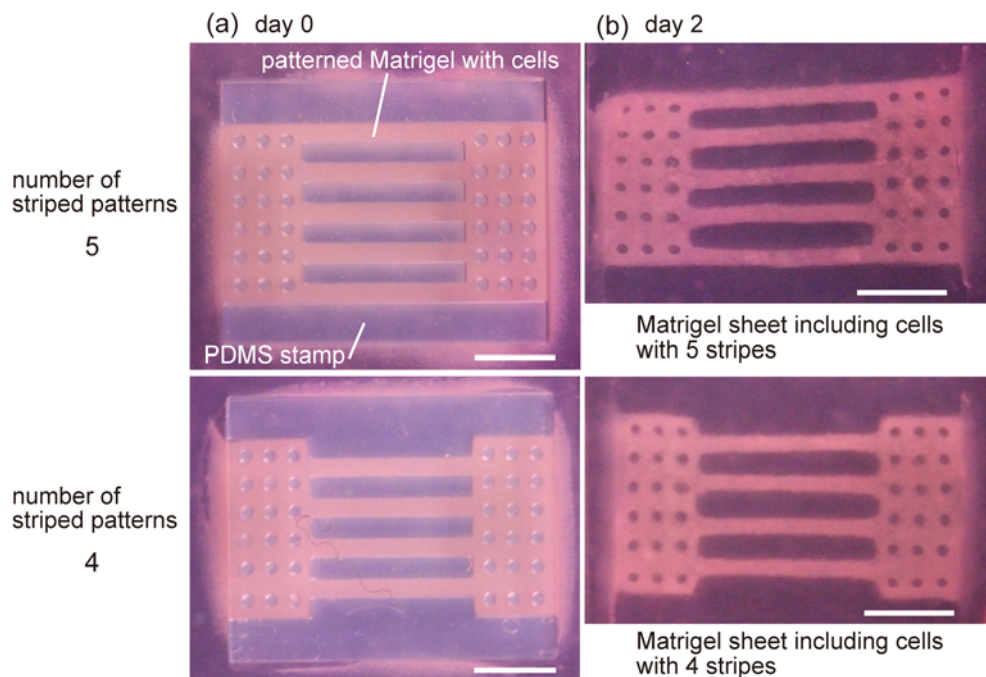


Fig. 3.15 (a)PDMS スタンプによるマトリゲルシートのパターンニング **(b)** 筋芽細胞含有のマトリゲルシート (スケールバー :2 mm)

幅マトリゲル構造が2次元アレイ化されたマトリゲルシートを構築した. **Fig. 3.15(a)**にPDMSスタンプにて筋芽細胞入りマトリゲルを型取っている様子を, **Fig. 3.15(b)**に2日間培養後にPDMSスタンプを外した後の筋芽細胞入りマトリゲルシートの様子を示す. この筋芽細胞含有マトリゲルシートをPDMS基板上にある固定部材に積層することにより, 細幅マトリゲルの構造の3次元アレイ化が実現される (**Fig. 3.16(a)**). 固定部材の幅と同じ寸法の溝があるPDMS基板を用意し, 固定部材をそのPDMS基板にある溝に嵌めることで固定されている. この際, **Fig. 3.15**に示したように長細い構造が4本または5本存在するシートを用意し互い違いに重ねることで, シートの積層時も長細い構造が重なり合わないようにする. 実際に, 長細い構造が4本または5本存在するシートを交互に積層した様子を **Fig. 3.16(b)**に示す. 筋芽細胞入りマトリゲルシートを固定部材上に積み重ねていくことで, 筋芽細胞含有の長細いマトリゲル構造の3次元アレイ化を実現した. 固定部材上での筋芽細胞培養の様子を **Fig. 3.16(b)-(e)**に示す. 固定部材上で徐々に筋芽細胞が多核化していき, 大きな骨格筋線維束が構築されることが確認できた.

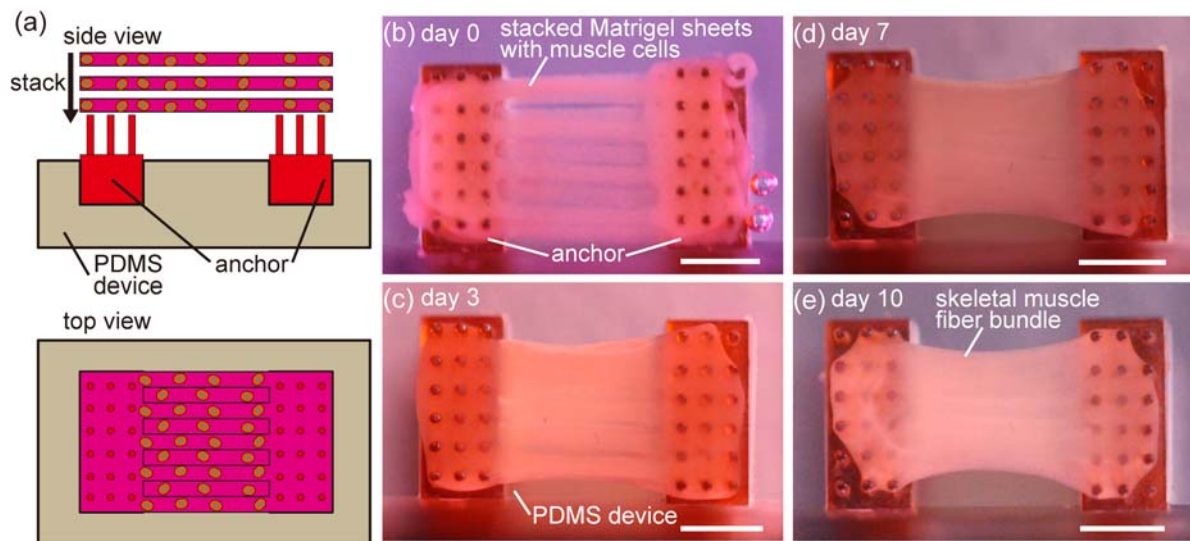


Fig. 3.16 筋芽細胞含有マトリゲルシートの積層状態での培養 (a) 概念図 (b)-(e) 固定部材上での培養の様子 (スケールバー : 2 mm)

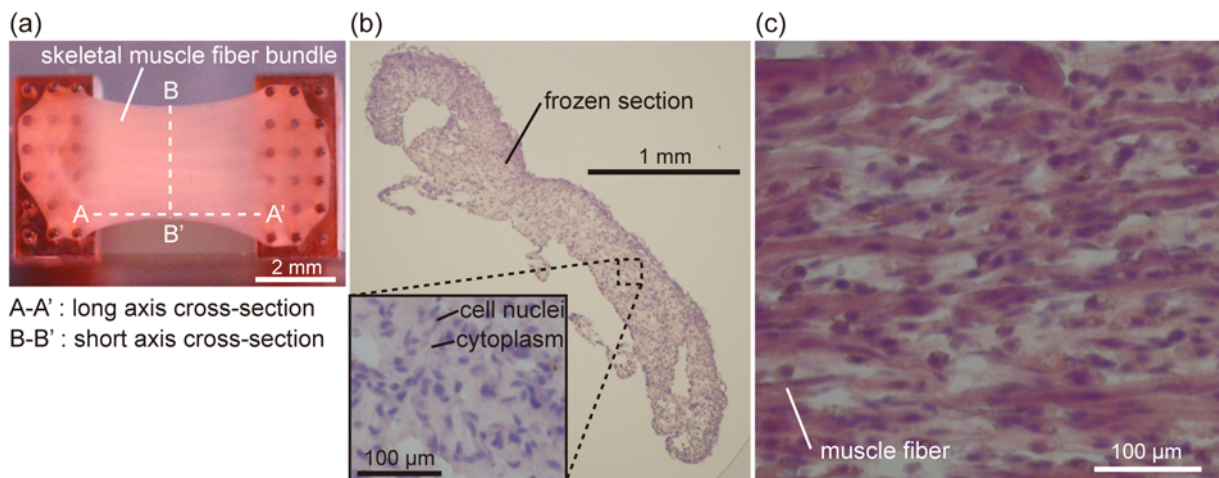


Fig. 3.17 骨格筋線維束の凍結組織切片 (a) 凍結組織切片の切り出し位置 (b) 短軸方向凍結組織切片 (c) 長軸方向凍結組織切片 (細胞核 : 青, 細胞質 : ピンク)

上記骨格筋線維束の細胞の状態を確認するため、骨格筋線維束の凍結組織切片を作製した。Fig. 3.17(a) に示す位置において厚さ $8\ \mu\text{m}$ の凍結組織切片を付録第 C.2 節に記載の方法にて作製した。Fig. 3.17(b) に短軸方向の骨格筋線維束の凍結組織切片をヘマトキシリン・イオシン染色 (HE 染色) し、細胞核を青色に細胞質をピンク色に染色した結果を示す。なお、HE 染

色の詳細な手順は付録第 C.3 節に記載の通りである。短軸方向の凍結切片画像より、作製された骨格筋線維束が約 1.5 mm^2 の断面積を有していることが分かった。Table 1.1 との比較より、提案の方法で作製された骨格筋線維束は、従来の方法で作製された骨格筋線維束の中でも、大きな断面積を有する骨格筋線維束の作製に適していることが分かった。加えて拡大画像より、外側から中心部まではほぼ全ての細胞核の形状が崩れていないことが確認された。細胞核の形状維持は細胞が生存していることを表すため、骨格筋線維束内の位置に関わらず細胞が生存していることが確認された。また、骨格筋線維束表層の長軸方向の凍結組織切片から作られた HE 染色画像より、骨格筋線維束中の骨格筋線維がほぼ同一方向に整列していることが確認された (Fig. 3. 17(c))。以上の凍結組織切片の観察結果より、筋芽細胞含有マトリゲルシートの積層により作製された骨格筋線維束では、ほぼ全ての細胞が生存した状態で骨格筋線維が同一方向に整列していることが示唆された。

本方法で作製された骨格筋線維束が生体に似た構造を有していることを確認するため、3.2.1 項と同様に筋小胞体の機能とサルコメアの存在について評価を行った。3.2.1 項に記述の方法でニカルジピン塩酸塩 ($5 \mu\text{M}$) を添加し、Fig. 3. 18(a) に表す参照点の移動距離の計測によるニカルジピン塩酸塩処理前後の収縮特性の比較結果を Fig. 3. 18(b) に示す。加えて、ニカルジピン塩酸塩処理 4 時間後に生死判定試薬 (LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells) により染色した様子を Fig. 3. 18(c) に示す。以上の結果より、ニカルジピン塩酸塩の処理は作製された骨格筋線維束の生死に影響することなく、電気刺激による収縮性を減衰させることから、作製された骨格筋線維束は筋小胞体が機能し収縮を発生していると考えられる。加えて、サルコメア構造の有無について α -アクチニンが縞状に分布していることで確認するため、 α -アクチニン抗体を使用して骨格筋線維束の免疫染色を行った。なお、免疫染色の方法は付録第 C.1 節に基づき、電気刺激 (電場 3 V/mm , 時間 20 ms , 間隔 1 Hz) を 10 分間かけた後に一晩培養してから行った。作製した骨格筋線維束を免疫染色した結果を Fig. 3. 19 に示す。 α -アクチニンが縞状の模様になっており、サルコメア構造を骨格筋線維が有していると考えられる。以上の結果より、筋小胞体と共にサルコメア構造も有していることが示唆され、作製された骨格筋線維束は生体に似た構造を保持していると考えられる。

本部分においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内) に出版予定) が予定されるため、非公開とする

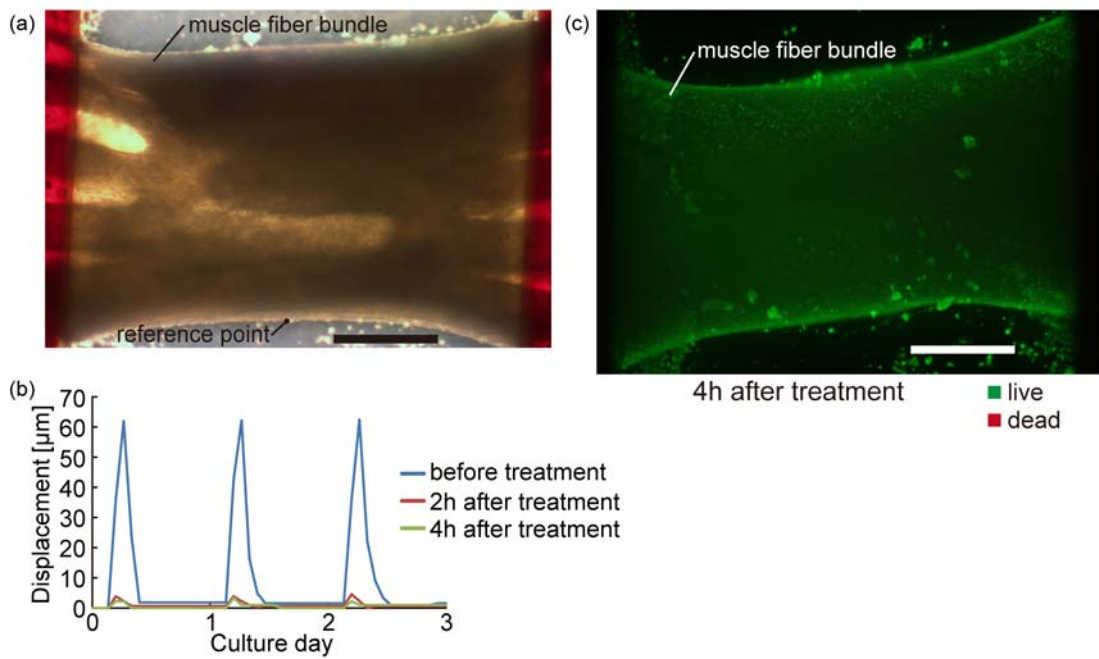


Fig. 3.18 (a) シート積層により作製した骨格筋線維束 (スケールバー 1 mm) (b) ニカルジピン塩酸塩処理前後における電気刺激に対する収縮特性 (電場 3 V/mm, 時間 20 ms, 間隔 1 Hz) (c) ニカルジピン塩酸塩処理後の骨格筋線維束 (生細胞: 緑, 死細胞: 赤)

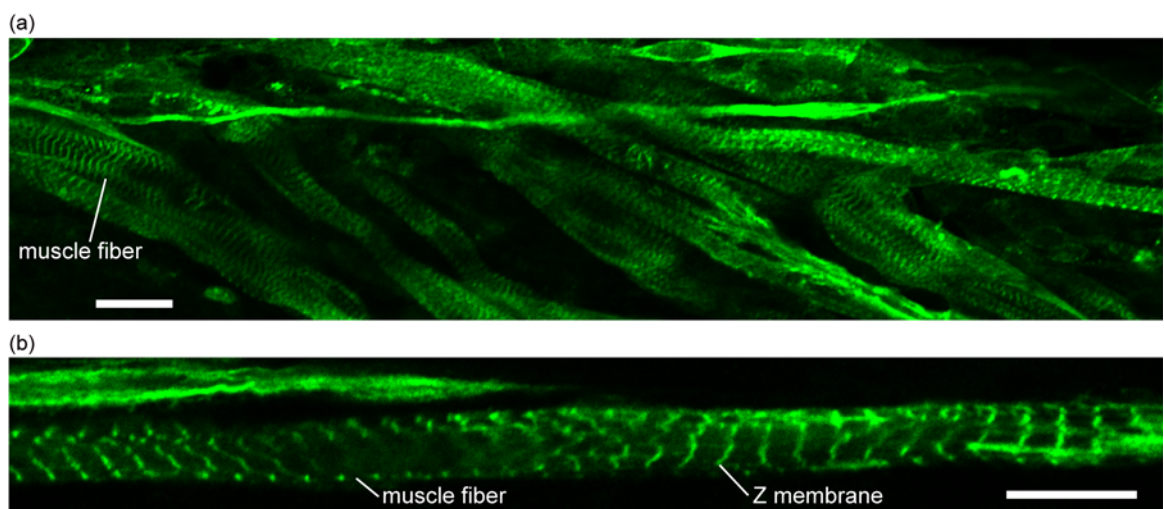


Fig. 3.19 シート積層により作製した骨格筋線維束における α -アクチニン (緑) の免疫染色画像 (スケールバー (a) 20 μm , (b) 10 μm)

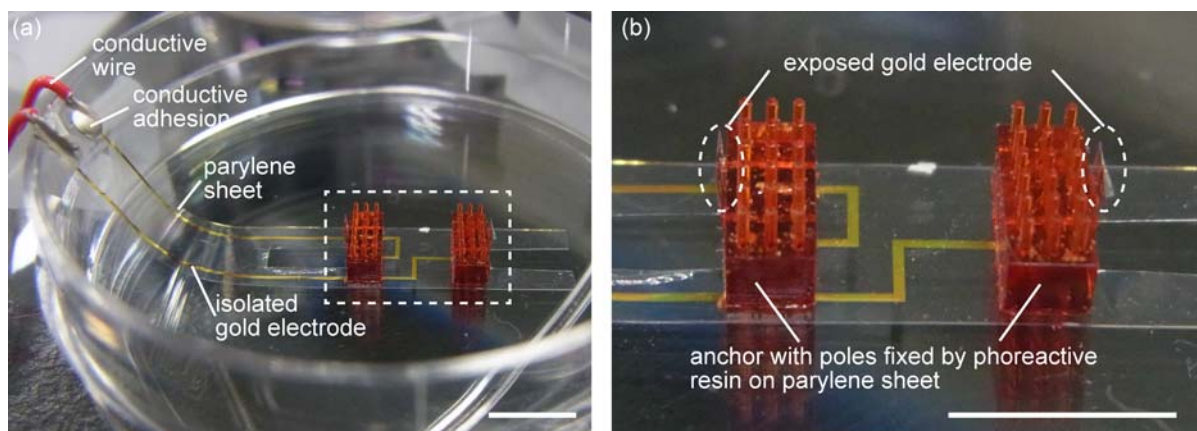


Fig. 3.20 固定部材付き柔軟電極基板 (a) 全体図 (b) (a) において破線四角で覆われた部分の拡大図 (スケールバー :5 mm) (©2013 IEEE)

3.3.2 シート積層により作製した骨格筋線維束の収縮特性

本項においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、非公開とする

3.4 柔軟電極基板上での骨格筋線維束の収縮特性

3.4.1 柔軟電極基板上での骨格筋線維束の構築

固定部材付き柔軟電極基板上にて骨格筋線維束を培養して、特定の骨格筋線維束のみに電気刺激を与えられる構造を構築した。まず、固定部材付き柔軟電極基板を作製した (Fig. 3.20)。このデバイスには、弾性基板としてのパリレンシートと固定部材、金電極を有している。固定部材の末端のみ金電極が露出しており、他の金電極部分はパリレンに覆われて絶縁されているため (Fig. 3.20(b))、導線を通じて固定部末端の電極から電気刺激を発生することができる。この基板上にある支持棒付き固定部材の上に、Fig. 3.15 に示した筋芽細胞含有マトリゲルシートを積層した。この状態で培養を行った様子を Fig. 3.21 に示す。柔軟電極基板上においても、培養 10 日後には Fig. 3.16 と同様に筋芽細胞から骨格筋線維束が構築できることが分かった。柔軟電極基板上で筋芽細胞を 10 日間培養し構築された骨格筋線維束を有するデバイスを、骨格筋アクチュエータとして後述の評価に使用する。なお、柔軟電極基板上で骨格筋線維束を培養するにあたり、骨格筋線維束の受動的張力で徐々に短縮していくことを防

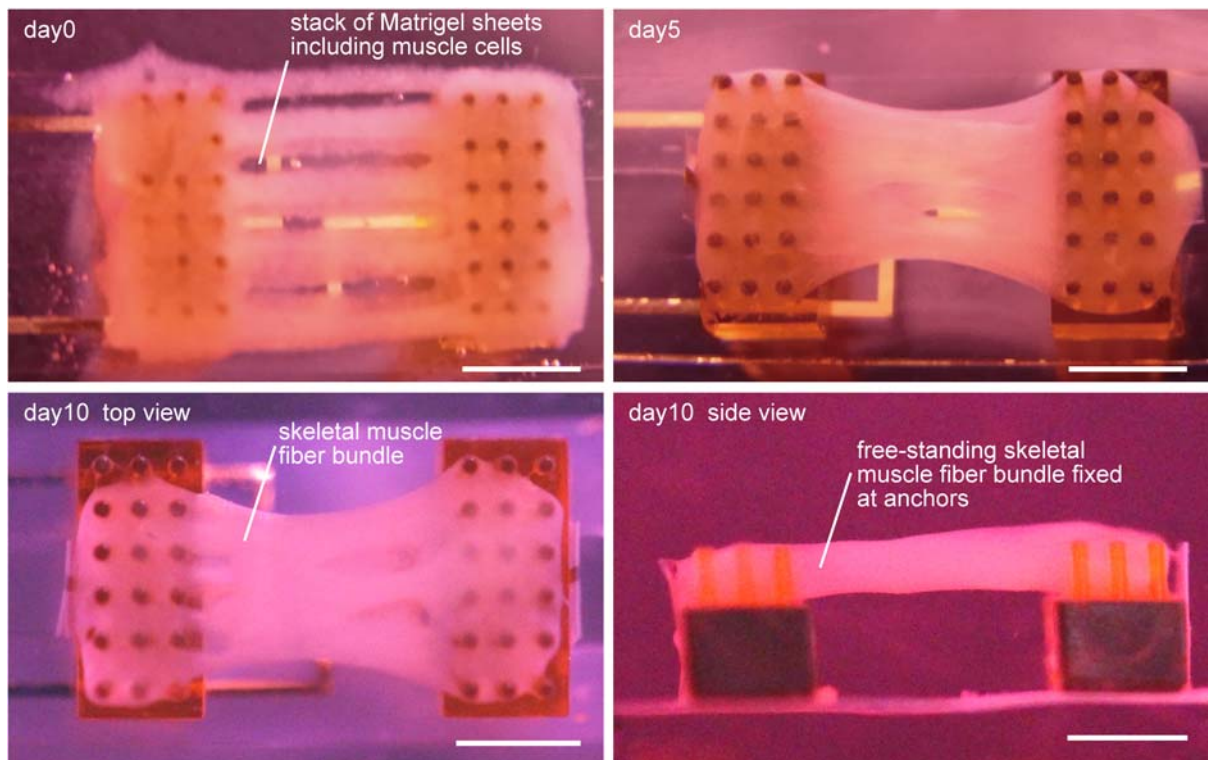


Fig. 3.21 柔軟電極基板上での骨格筋線維束の培養 (スケールバー :2 mm) (©2013 IEEE)

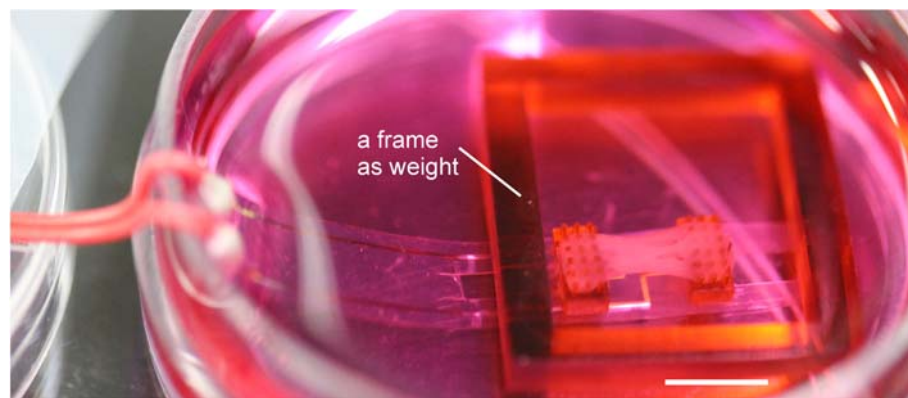


Fig. 3.22 柔軟電極基板上での骨格筋線維束培養の様子 (スケールバー : 5 mm)

ぐため、四角い枠形状の重しを基板上に載せることで基板の変形を抑えたまま培養した (Fig. 3.22). 骨格筋アクチュエータ内において作製された骨格筋線維束は端部のみ固定部材に固定されているため、収縮によって柔軟電極基板が変形することが期待される.

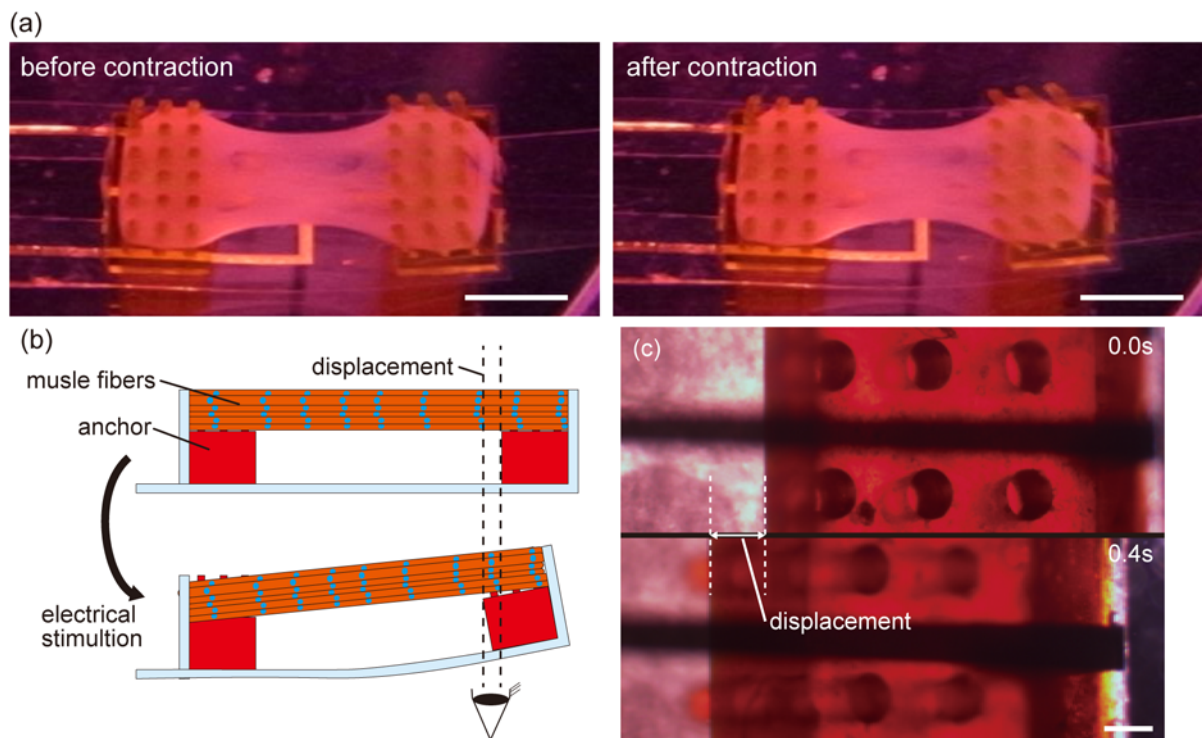


Fig. 3.23 (a) 骨格筋アクチュエータ駆動の様子 (b) 骨格筋アクチュエータの移動量測定方法の概念図 (c) 骨格筋アクチュエータの移動量測定の様子 (スケールバー:(a) 2 mm, (c) 200 μ m) (©2013 IEEE)

3.4.2 柔軟電極基板上での骨格筋線維束の収縮特性

パリレンシート上にある金電極を通して骨格筋線維束への電気刺激を行った。電気刺激を行うと、骨格筋線維束が収縮することにより基板が変形する (Fig. 3.23(a))。骨格筋アクチュエータの駆動特性を定量的に評価するために、電気刺激によって駆動した骨格筋アクチュエータの先端部の移動量を計測した (Fig. 3.23(b, c))。まず、電気刺激に応じて骨格筋アクチュエータの駆動が起きるかどうかを確認するために、1 Hz の頻度で電気刺激を与えた時の駆動特性を調査した (Fig. 3.24(a))。骨格筋アクチュエータの駆動が電気刺激と同様に 1 Hz で行われていることから、骨格筋アクチュエータの駆動は電気刺激によって開始できることが確認された。また、2.2.4 項より骨格筋アクチュエータにある骨格筋線維束の収縮力が増大すると、骨格筋アクチュエータの先端部の移動量も増加するため、この移動量の計測は骨格筋線維束の収縮力を見る指標になると考えられる。そこで、骨格筋線維束の培養日数と骨格筋アクチュエータ先端部の移動量の関係性を評価したグラフを Fig. 3.24(b) に示す。この結果より、培養日

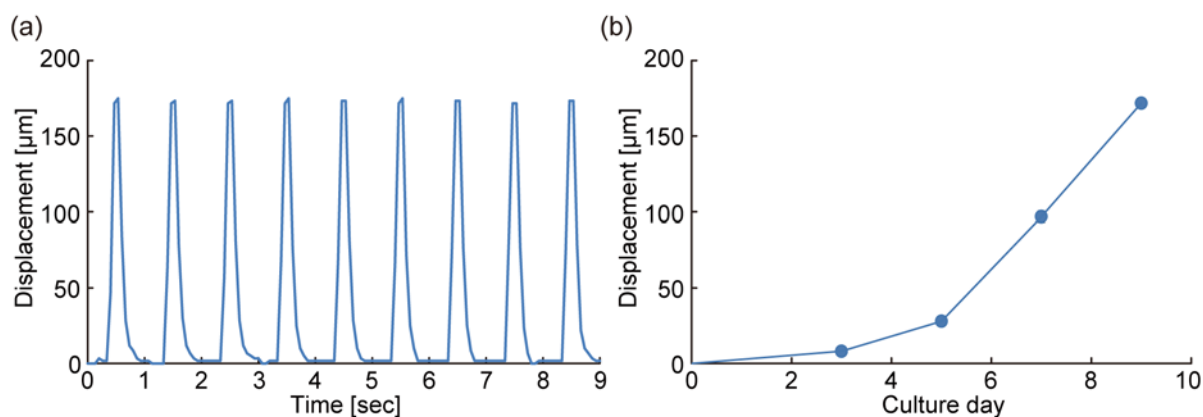


Fig. 3.24 骨格筋アクチュエータ先端部の移動量 (a) 電気刺激 (3 V/mm (30 V を 10 mm 間隔), 20ms, 1 Hz) との関係 (b) 培養日数との関係 (電気刺激: 3 V/mm (30 V を 10 mm 間隔), 20ms)

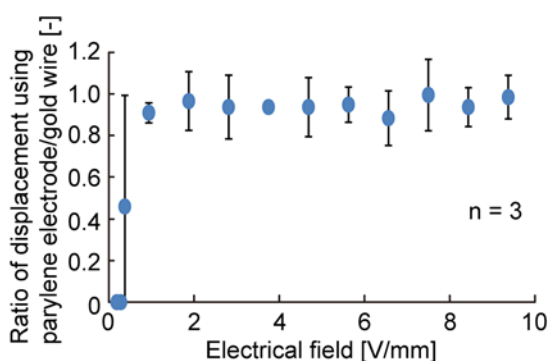


Fig. 3.25 柔軟電極基板に含まれる金電極と金ワイヤを通した電気刺激への骨格筋アクチュエータ先端部の移動量の比較 (電気刺激: 20ms)

数を経つにつれて筋芽細胞から骨格筋線維束の構築が進むことで収縮力が増大し、骨格筋アクチュエータの移動量が増加することが分かった。以上の結果より、提案の固定部材付き柔軟電極基板上においても、骨格筋線維束は培養可能であり収縮性を発揮できることが確認された。

次に、提案の方法で作製された固定部材付き柔軟電極基板を通じて電気刺激を与える場合と、3.4 項のように 10 mm 間隔で設置した金ワイヤを用いて刺激した場合の骨格筋アクチュエータ先端部の移動量の差を評価した。Fig. 3.25 に記載の結果より、0.5 V/mm 以上の強さの電気刺激において両者の間に大きな差は生じなかったが、0.5 V/mm 以下の弱い電気刺激においては両者の間で大きなずれが生じた。以上の結果より、0.5 V/mm 以上の強さの電気を供給

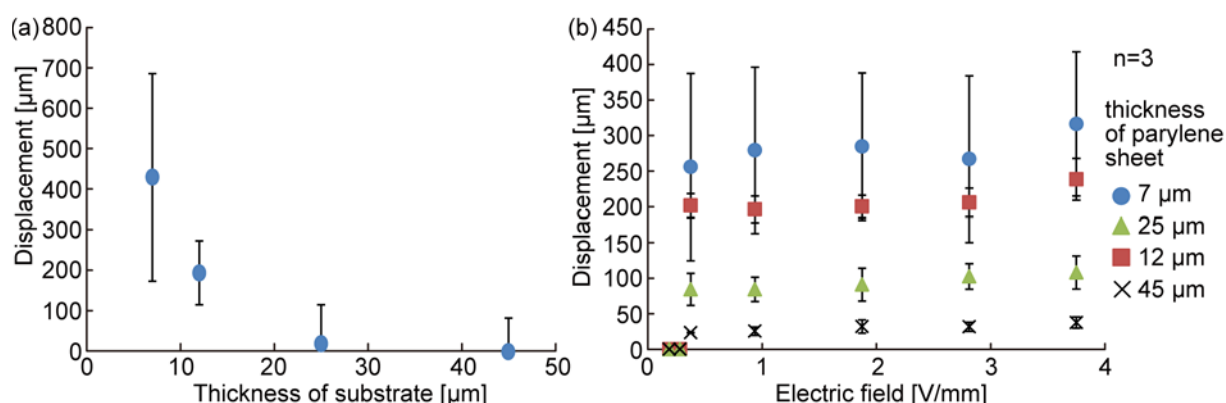


Fig. 3.26 柔軟電極基板の厚さと骨格筋アクチュエータ先端部の移動量の関係 (a) 電気刺激前 (b) 電気刺激前後の移動量差と電気刺激の強さの関係 (電気刺激：間隔 8mm, 時間 20 ms)

する場合は、柔軟電極基板は金ワイヤを使用した時と同等の電気刺激を骨格筋線維束に与えることができ、骨格筋線維束の収縮性に影響を与えないことが示された。

本部分においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、非公開とする

次に、骨格筋アクチュエータ上での骨格筋線維束の収縮力特性が、3.4 項の骨格筋線維束と同じ傾向を有していることを検証する。そのために、骨格筋アクチュエータ先端部の移動量と柔軟電極基板の厚さの関係を評価した。柔軟電極基板の厚さは、ガラス板に蒸着したパリレンシートと金電極の絶縁部を設けるために再度蒸着したパリレンの厚さの合計を調整することで制御した。厚さ 7 μm と 12 μm, 25 μm, 45 μm の柔軟電極基板を用いた骨格筋アクチュエータの電気刺激量に対する駆動特性を Fig. 3.26 に示す。この結果より、柔軟電極基板の厚みに関わらず 0.4 V/mm 以上の電気刺激に反応性を示していることから、柔軟電極基板の厚さは骨格筋線維束への電気刺激の伝達効率に影響を与えないことが確認された。また、柔軟電極基板の厚さを大きくすることによって骨格筋アクチュエータ先端部の移動量が小さくなることが分かった。この時、柔軟電極基板の厚みが 7 μm の時にエラーバーが他の条件に比べて大きくなった。これは柔軟電極基板が薄いことにより変形が不安定であること、または Fig. (非公開) に記載の短縮が発生していることが影響しているためだと予想される。本骨格筋アクチュエータ先端部の移動量の実験結果を、2.2.4 項に記載の移動量と収縮力の関係を示したシミュレーション結果に照らし合わせることで、骨格筋アクチュエータ上で発生した骨格筋線維束の収縮力を推定した。Fig. 3.27 に各々の柔軟電極基板厚さに対する 2.8V/mm の

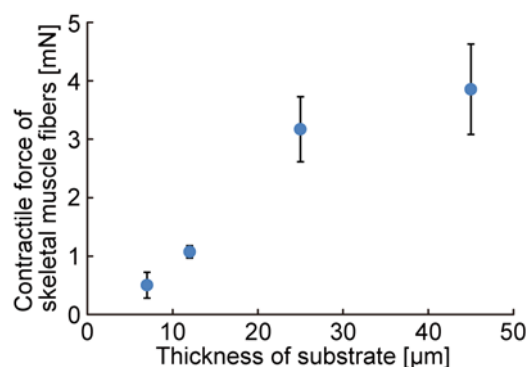


Fig. 3.27 柔軟電極基板厚さと骨格筋線維束の推定収縮力の関係

電気刺激を与えた時の推定収縮力を示す。この結果より、骨格筋線維束が大きな収縮量を示す薄い柔軟電極基板を用いた骨格筋アクチュエータでは収縮力が小さく、収縮量の小さい厚い柔軟電極基板を用いた骨格筋アクチュエータでは収縮力が大きくなる傾向が示された。この収縮量の大小で収縮力が増減する傾向は、3.4項に記載したマトリゲルシートの積層で構築された骨格筋線維束の収縮力特性と同じ傾向であった。この結果より、骨格筋アクチュエータ上の骨格筋線維束の収縮力特性は、3.4項の骨格筋線維束と同じ傾向の収縮力特性を有していると考えられる。

この収縮力特性の同一性を確認するため、3.4項で求めた式(非公開)の係数を用いて、実験結果通りに骨格筋アクチュエータが駆動した際の骨格筋線維束の収縮力を算出した。ただし3.4項と Fig. 3.26 より、骨格筋線維束の収縮力の算出には収縮前後の骨格筋線維束長の差が 0.15 mm から 0.25 mm に収まる必要があるため、厚さ 12 μm の柔軟電極基板を用いて算出を行った。また、骨格筋アクチュエータ先端部の移動量が骨格筋線維束長の変化と同等と見なせると仮定した。以上の条件より収縮力を算出すると、厚さ 12 μm の柔軟電極基板を用いた骨格筋アクチュエータにおいて、骨格筋線維束が発生する収縮力は Fig. 3.27 の結果 (1.07±0.10 mN) と算出値 (1.50 mN) で差が生じたがオーダーは一致していた。両者の値の差は、骨格筋アクチュエータの駆動では骨格筋線維束の短縮が発生しており、算出値ではその点が考慮されていなかったためだと思われる。本結果から、骨格筋アクチュエータ上の骨格筋線維束の収縮力特性は、3.4項の骨格筋線維束とほぼ同等の特性を有していると考えられる。そのためシート積層方法は任意の位置に骨格筋線維束を配置可能であり、その骨格筋線維束はデバイスに依らず電気刺激に対して同程度の収縮力特性を発揮できることが示唆された。加えて、作製した骨格筋線維束の式(非公開)における各係数と、デバイスの変形特性を明らかに

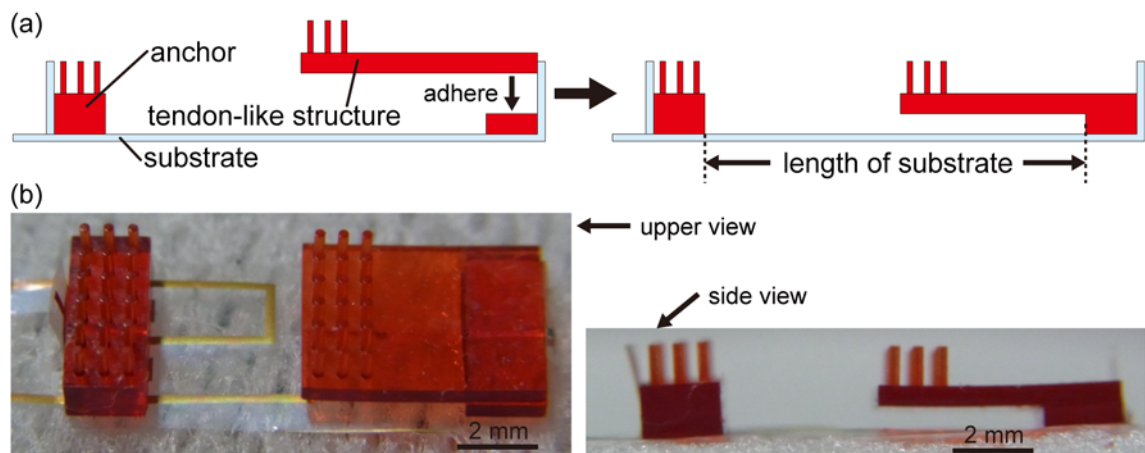


Fig. 3.28 (a) 腱様構造を有するデバイスの作製方法 (b) 腱様構造を有するデバイス

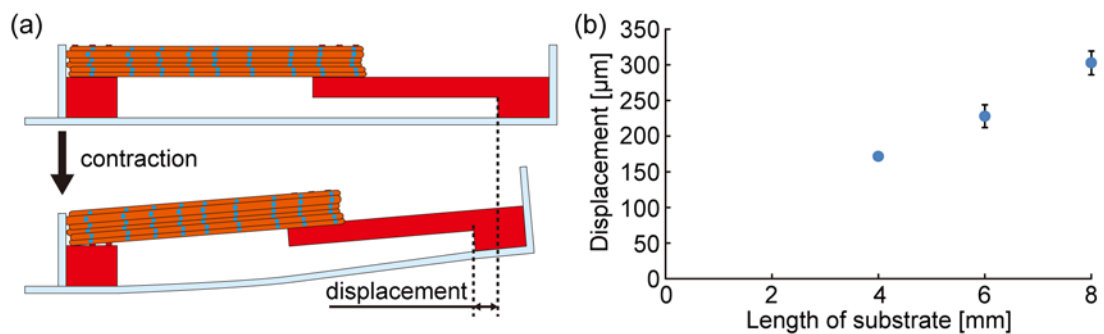


Fig. 3.29 (a) 腱様構造を有する骨格筋アクチュエータの駆動量測定方法 (b) デバイス基板の長さとの移動量の関係

することで、骨格筋アクチュエータの駆動をおおよそ推定できることが期待される。その結果、式(非公開)における各係数を計測することにより、骨格筋線維束にとって最適なデバイスを設計可能になると考えられる。

3.4.3 腱様構造を有する骨格筋アクチュエータの駆動特性

2.2.4 項のシミュレーション結果より、基板長を長くすることにより同じ収縮力であっても骨格筋アクチュエータを大きく駆動できることが示されている。本特性を実証するために、Fig. 3.28(a)に示すように片方の固定部材の上に腱様構造を接着させることで、同寸法の骨格筋線維束を配置させながら基板長を変化できるようにした。Fig. 3.28(b)に実際に作製した腱

様構造を有するデバイスを示す。本デバイスの固定部材上にある柱に沿うように筋芽細胞含有マトリゲルシートを積層することで、腱様構造を有する骨格筋アクチュエータを構築した。また、各基板の厚さを $12\ \mu\text{m}$ に設定し、基板厚さは変更しないようにした。本デバイス上にある骨格筋線維束に、配置された電極を通して $3\ \text{V/mm}$ の強さで電気刺激を与えた。この時の駆動量を **Fig. 3. 29(a)** に示した参照点の水平方向の移動量を計測することによって評価した。**Fig. 3. 29(b)** にその参照点の移動量と基板長さの関係を示す。本結果より 2.2.4 項記載のシミュレーション結果と同様に、同じ条件で作製した骨格筋線維束を用いても基板長さが長くなるとデバイス駆動量が増加することが確認された。以上より、骨格筋アクチュエータを大きく駆動させるためには、骨格筋線維束の収縮力を増加させるだけでなくデバイス基板の長さを増加することも有効であることが示された。

3.5 結言

本章では、本研究で提案する筋芽細胞を含有したマトリゲル構造の幅を調整することにより、線維長・成熟度・配向度・単位断面積当たりの収縮力が制御できることが分かった。さらに、この実験結果を第 2 章で提案した骨格筋線維束の収縮モデルと合わせてみると、おおよそ適合することが分かった。以上の結果、本収縮モデルを用いることにより骨格筋線維束の収縮力を推定できることが期待され、収縮力向上には筋芽細胞含有の細幅マトリゲル構造を使用することが有効であることが示された。また、細幅マトリゲル構造内で筋芽細胞を培養することによる骨格筋線維束の特性向上は、筋芽細胞の種類に依らない性質であることが本研究より示唆されており、ヒトなど他の生物の骨格筋線維束の構築に用いることができると考えられる。

細幅の筋芽細胞含有のマトリゲル構造を 3 次元アレイ化することにより、作製される骨格筋線維束の断面積が増加し、約 $1.5\ \text{mm}^2$ になることが分かった。細幅マトリゲル構造の 3 次元アレイ化により構築された骨格筋線維束の収縮力は約 $5.36\ \text{mN}$ であり、同寸法のマトリゲルブロック構造から構築された骨格筋線維束の収縮力は約 $1.32\ \text{mN}$ より 4 倍の大きさの収縮力が得られることが分かった。本結果は提案の方法で作製された骨格筋線維束は新生児同等の収縮力を有していることを示しており、サルコメア構造や筋小胞体の存在が示唆されていることから、生体が有している骨格筋線維束に近いものが体外にて構築できたと考えられる。また、作製された骨格筋線維束は能動的張力が受動的張力より 4 倍以上 (培養長時) あることも分かった。能動的張力より受動的張力が大きいことから、提案の骨格筋線維束はデバ

イスを変形させるのに適していると考えられる。加えて、提案の骨格筋線維束は低消費電力で駆動可能なソフトアクチュエータの特性を有していることも分かった。本論文の実験系において平均 0.3 mW 程度 (4 V, 3.5 mA, 20 ms) のエネルギーを有する電気刺激で骨格筋線維束の収縮が可能となっており、ポンプを必要とする空気圧アクチュエータ (ex. 約 20 mW (超小型送液ポンプ)^[107]) やモータを必要とするワイヤ駆動型アクチュエータ (ex. 約 50 mW (振動用小型モータ)^[108])、導電性高分子人工筋肉 (ex. 約 30 mW^[109]) よりもより消費電力が低い。作製した骨格筋線維束を成体の筋肉同様の収縮力まで今後上昇させることができれば、高エネルギー効率で駆動可能なソフトアクチュエータとして用いることができると期待される。

提案の骨格筋線維束を固定部材付き柔軟電極基板上に配置することによって、約 300 μm の移動量を発生する骨格筋アクチュエータを構築することに成功した。この骨格筋アクチュエータにおける骨格筋線維束の収縮力特性は、固定部材を PDMS デバイスで固定した両条件での骨格筋線維束の収縮力特性とおおよそ等しいことが示された。このことから、提案の方法で作製された骨格筋線維束は、デバイスの種類に影響を受けず、同等の収縮力特性を発揮できることが示された。ただし、骨格筋線維束の収縮にて駆動可能な骨格筋アクチュエータにおいては、経時的に骨格筋線維束の短縮が発生し収縮性が低下してしまい、42 時間後には骨格筋線維束の収縮が見られなくなった。以上より、骨格筋線維束の受動張力に応じた抗力を常に負荷することが、継続的な構造と収縮性の維持に必要なことが確認された。

第4章 骨格筋線維束の応用検討

4.1 緒言

この章では、提案の方法で作製された骨格筋線維束の応用例を検討し、創薬やバイオアクチュエータへの応用可能性を実証する。まず、神経刺激による骨格筋線維束の駆動(4.2.1項-4.2.3項)と空気中での骨格筋線維束の駆動(4.2.4項-4.2.6項(非公開))を単一骨格筋線維束を用いて実現する。両応用例は拮抗筋構造にて実現するのが理想であるが、拮抗筋構造へ拡張可能な方法により実現することで、将来の拮抗筋構造での骨格筋線維束の薬物動態試験や空気中での駆動するバイオアクチュエータへの応用可能性を示す。最後に、任意の位置に骨格筋線維束を配置することができるというシート積層法の利点を生かし、拮抗筋構造を実現する。拮抗筋構造の応用例として、リンク機構を駆動部とする拮抗筋を有するアクチュエータを作製し、体外において骨格筋線維束の形状と収縮特性が継続的に維持されるだけでなく、収縮・伸展運動が可能であることを示す。

4.2 単一骨格筋線維束を用いた応用検討

4.2.1 神経-筋肉組織の構築

骨格筋線維束と運動ニューロンから構成される組織を構築し、その組織中にて神経筋接合部の形成を行った。骨格筋線維と運動ニューロンの接合面に神経筋接合部が存在していると、神経筋接合部を通じてアセチルコリンが運動ニューロンから骨格筋線維に流入し、収縮が実現される(Fig. 4.1)。このような組織を構築するために、神経幹細胞のスフェロイドを2.3.1項

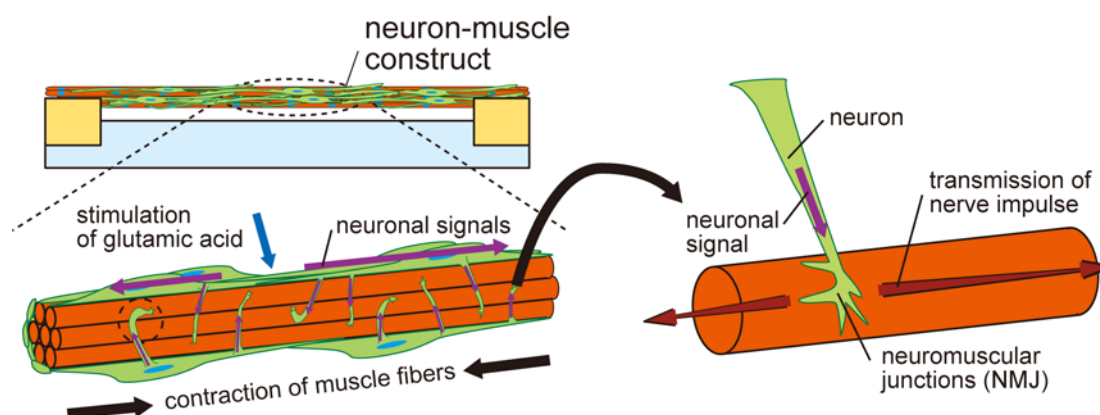


Fig. 4.1 神経刺激による骨格筋線維の収縮 概念図 (©2013 Elsevier)

に示した方法で作製された骨格筋線維束上に接着させた。その後、骨格筋線維束上にて神経幹細胞を運動ニューロンに分化させた。神経幹細胞は神経への分化過程において高い遊走性を持っているため^[110]、分化によって運動ニューロンの再配置が行われ、運動ニューロンと骨格筋線維束の安定的な接着が実現された。この運動ニューロンと骨格筋線維束からなる組織を神経-筋肉組織と呼ぶこととする。以下に神経-筋肉組織の具体的な構築方法について記述する。

胎児の脳由来の神経幹細胞は運動ニューロンに分化可能なため^[111]、神経-筋肉組織の構築にあたり胎児脳由来の神経幹細胞を使用した。神経幹細胞は妊娠 13.5 日目の ICR マウスの胎児の中脳部分から分離し^[112]、分離した神経幹細胞は成長用培地で培養した。神経幹細胞の分離方法と成長用培地の詳細はそれぞれ付録第 A.1 節と付録第 A.2 節に記載する。神経幹細胞は浮遊細胞であるため培養皿に接着することなく、培養約 1 週間後にはスフェロイドが形成される。なお、神経幹細胞は継代回数が 2 回以下の細胞のみを実験に使用した。また、本節において骨格筋線維束は C2C12 を用いて 2.3.1 項の方法により作製した。

骨格筋線維束に神経幹細胞のスフェロイドを接着させるため、骨格筋線維束上に神経幹細胞のスフェロイドを撒いた。ただし、神経幹細胞のスフェロイドは球形状をしているため、それだけでは骨格筋線維束上から滑り落ちてしまう。この問題を解決するため、骨格筋線維束の周囲にある培地を吸い取った。微量に残った培地の表面張力によって骨格筋線維束が変形し PDMS 基板に固定され動かなくなると同時に、この表面張力が神経幹細胞スフェロイドを骨格筋線維束に接触した状態で固定する (Fig. 4.2(a))。これにより、神経幹細胞スフェロイドと骨格筋線維束が直接接触した状態での培養が可能となる。この状態で高湿度環境にて 1

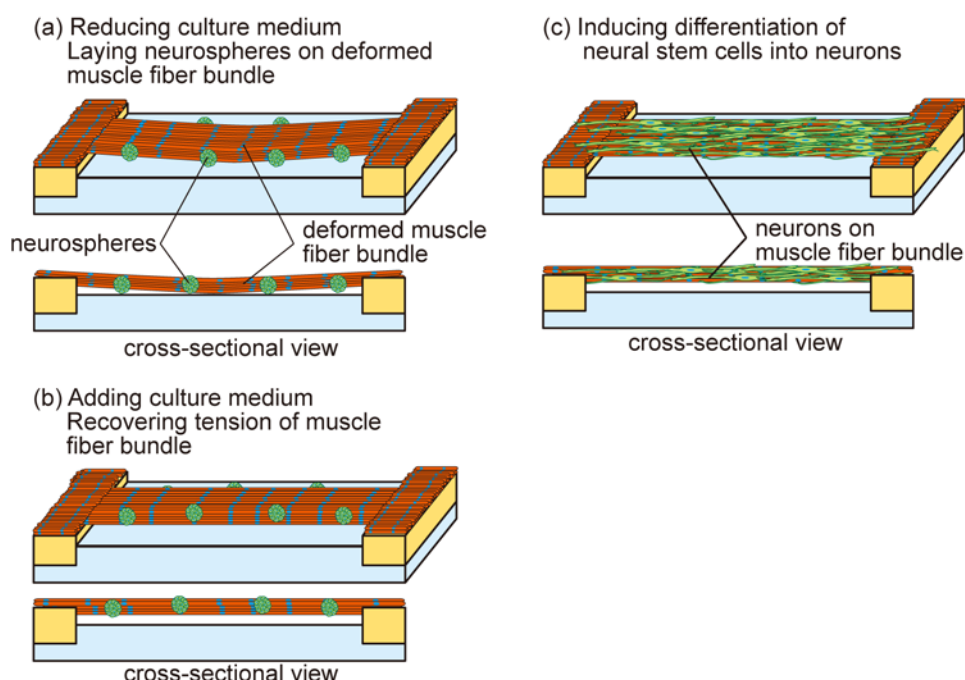


Fig. 4.2 神経－筋肉組織の構築方法. (a) 神経幹細胞スフェロイドと骨格筋線維束の接触 (b) 神経幹細胞付き骨格筋線維束 (c) 神経－筋肉組織の構築. (©2013 Elsevier)

時間培養を行い、神経幹細胞を骨格筋線維束上に接着させた。その後培地を追加することで神経幹細胞スフェロイド付き骨格筋線維束がPDMS基板から離れて、端部のみが固定された状態に戻した (**Fig. 4.2(b)**)。最後に、神経幹細胞の分化用培地にて培養を行うことで、骨格筋線維束上で神経幹細胞が神経へと分化し、神経－筋肉組織が構築された (**Fig. 4.2(c)**)。神経幹細胞の分化用培地は付録第A.2節に記載のとおりである。なお、神経幹細胞の分化過程においては、分化用培地を毎日半分の量ずつ新しいものに交換した。これは神経幹細胞自身から出される成長因子が培地中に常に一定程度含有している状態を維持するためである。

上記方法にて作製した神経幹細胞スフェロイド付き骨格筋線維束を **Fig. 4.3(a, b)** に示す。この状態では、周囲の培養液に振動を与えても神経幹細胞スフェロイドは骨格筋線維束から落ちることがなく、神経幹細胞スフェロイドと骨格筋線維束の間で安定した接着がなされていることが分かった。また、神経幹細胞スフェロイドと神経幹細胞単体を比較すると、本方法においては神経幹細胞単体の方が骨格筋線維束との安定した接着が行われにくい。これは神経幹細胞スフェロイド (直径約 100 – 200 μm) は神経幹細胞単体 (約 10 μm) よりも大きく接着面積が大きいため、効率良く骨格筋線維束との接着が行われるためだと思われる。この

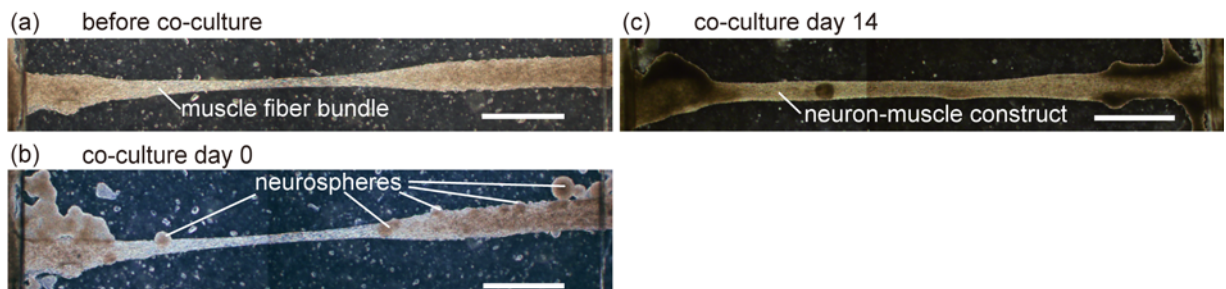


Fig. 4.3 神経-筋肉組織の構築 (a) 骨格筋線維束 (b) 神経幹細胞スフェロイド付き骨格筋線維束 (c) 神経-筋肉組織 (スケールバー :1 mm) (©2013 Elsevier)

ように骨格筋線維束と神経幹細胞スフェロイドが安定して接着した状態で分化用培地で培養すると、骨格筋線維束上で神経幹細胞スフェロイドは徐々に小さくなっていき、神経幹細胞または神経細胞が骨格筋線維束上を遊走して骨格筋線維束を覆うようになった (**Fig. 4.3(b, c)**). 培養 14 日後には神経-筋肉組織が構築された (**Fig. 4.3(c)**). 以上の結果は、提案の方法が多数の神経細胞を骨格筋線維束上に接着させるのに適していることを示している。

神経細胞が骨格筋線維束上を覆っていることを確認するために、神経細胞と骨格筋線維束をそれぞれ抗 β チューブリン(神経)と蛍光体付き α ブンガロトキシンを用いて免疫染色を行い、共焦点顕微鏡にて観察した。ブンガロトキシンはヘビ毒の一種であり、骨格筋線維上に存在するアセチルコリン受容体にのみ付着する特性を持っているため使用した。免疫染色の詳細な条件は付録第 C.1 節に記載のとおりである。**Fig. 4.4(a)** に示したように、神経-筋肉組織の断面を観察すると、骨格筋線維束が神経細胞により表面を被覆されていることが分かった。この時の神経細胞の配向を 3.2.4 項の方法で評価すると、骨格筋線維束の長軸方向に神経細胞が整列していることが分かった (**Fig. 4.4(b, c)**). この結果は、神経細胞または神経幹細胞が骨格筋線維束の表面を線状模様であると認識して、骨格筋線維と同方向に神経細胞が進展したことを示唆している。

4.2.2 神経-筋肉組織における神経筋接合部の評価

神経筋接合部は運動ニューロンと骨格筋線維束のとの間に存在し、運動ニューロンから発生したアセチルコリンを骨格筋線維上のアセチルコリン受容体に供給する部分である。また、神経筋接合部においては骨格筋線維に発現しているアセチルコリン受容体が集合しているこ

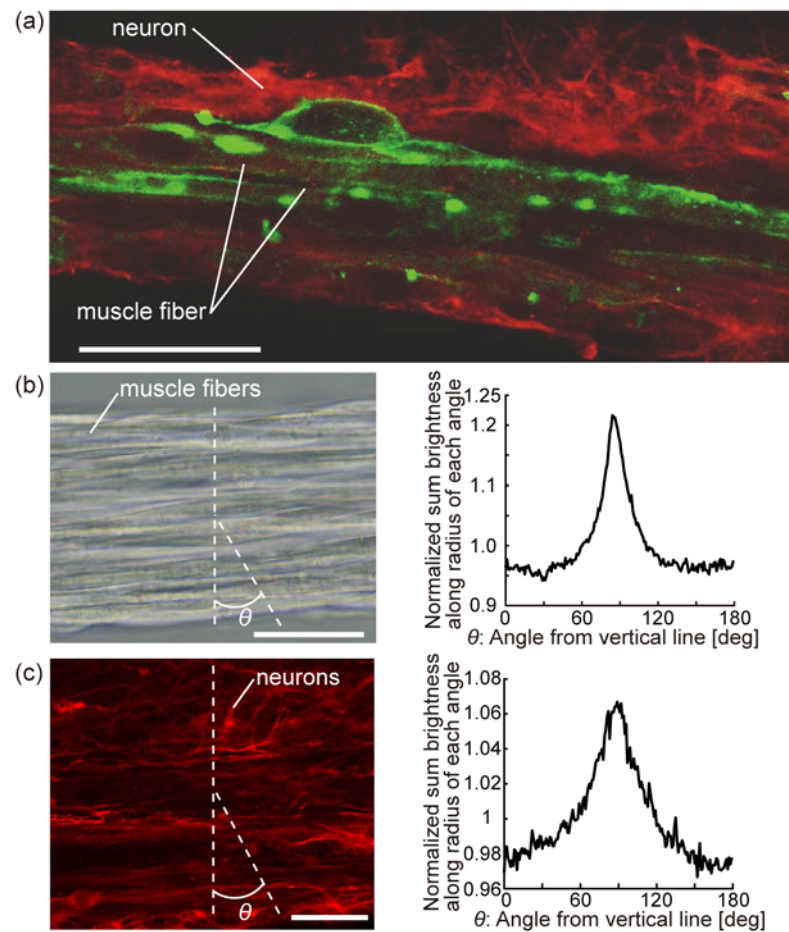


Fig. 4.4 8(a) 神経－筋肉組織の断面図 (赤：神経，緑：骨格筋線維) (b) 骨格筋線維束の画像と方向分布 (c) 骨格筋線維束上における神経細胞の画像と方向分布 (スケールバー：50 μm) (©2013 Elsevier)

とが知られている。そのため、神経－筋肉組織内に神経筋接合部が確立しているかの評価には運動ニューロンの存在とアセチルコリン受容体の集合の確認が必要となる。

神経幹細胞から分化した神経細胞が運動ニューロンであるかどうかを確認するために、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) を行い、*Hlxb9* と *GAPDH* の発現を評価した。*Hlxb9* は運動ニューロンのマーカー遺伝子であり、*GAPDH* は全ての細胞に含まれるハウスキーピング遺伝子である。RT-PCR にあたり、まず神経－筋肉組織と骨格筋線維束から mRNA を分離した。精製した mRNA を用いて、対応する cDNA を合成した。この cDNA は PCR におけるテンプレートとして働き、各々の遺伝子のプライマーを用いることで mRNA に遺伝子配列が含

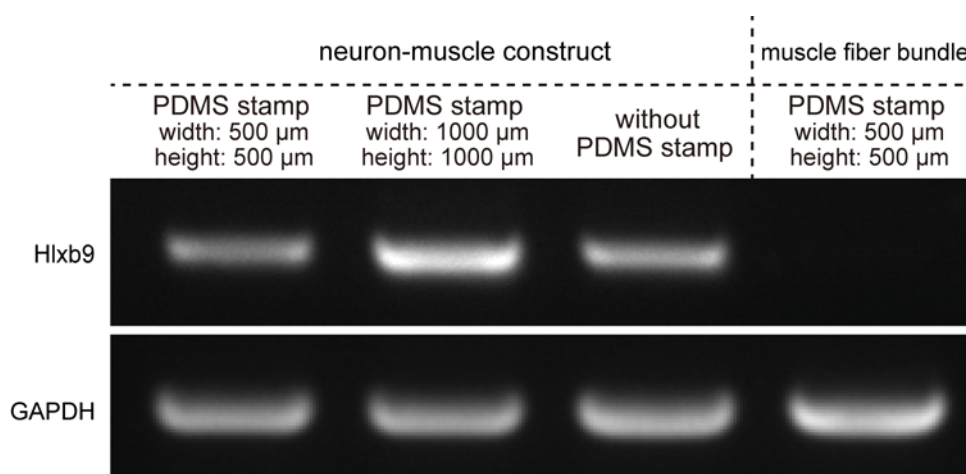


Fig. 4.5 神経-筋肉組織と骨格筋線維束における *Hlxb9* と *GAPDH* の発現 (©2013 Elsevier)

まれるかどうかを評価した. RT-PCR の詳細な方法と使用した *Hlxb9* と *GAPDH* のプライマー配列は付録第 C.4 節のとおりである.

幅と高さともに 500 μm の PDMS スタンプを用いて作製した骨格筋線維束と、幅・高さ 500 μm または 1000 μm の PDMS スタンプを用いて作製した骨格筋線維束と PDMS スタンプを用いずに作製した骨格筋線維束から構築した神経-筋肉組織を使用して RT-PCR を行った結果を **Fig. 4.5** に示す. この結果より, *Hlxb9* の発現は神経-筋肉組織の方が骨格筋線維束より多く, 骨格筋線維束上で神経幹細胞は運動ニューロンに分化していることが示唆された. また, 免疫染色にて神経細胞とアセチルコリン受容体を可視化することにより, アセチルコリン受容体の集合を評価した. **Fig. 4.6** に神経-筋肉組織の共焦点画像を示す. この結果より, 骨格筋線維と神経細胞の接触点においてアセチルコリン受容体の集合が構築できている部分があることが確認された. アセチルコリンの受容体の集合は神経筋接合部の存在指標となるため, この結果は複数の神経筋接合部が神経-筋肉組織に構築されていることを示唆している.

4.2.3 神経刺激による骨格筋線維束の収縮特性

神経-筋肉組織内にある神経筋接合部が機能的に活動することを確認するために, 神経刺激に反応して発生する骨格筋線維束の収縮を観察した. 運動ニューロンから神経刺激を発生させるために, グルタミン酸溶液 (400 μM) を神経-筋肉組織にかけることにより運動ニューロンを化学的に刺激し活性化させた. このグルタミン酸溶液の刺激により発生した神経-筋

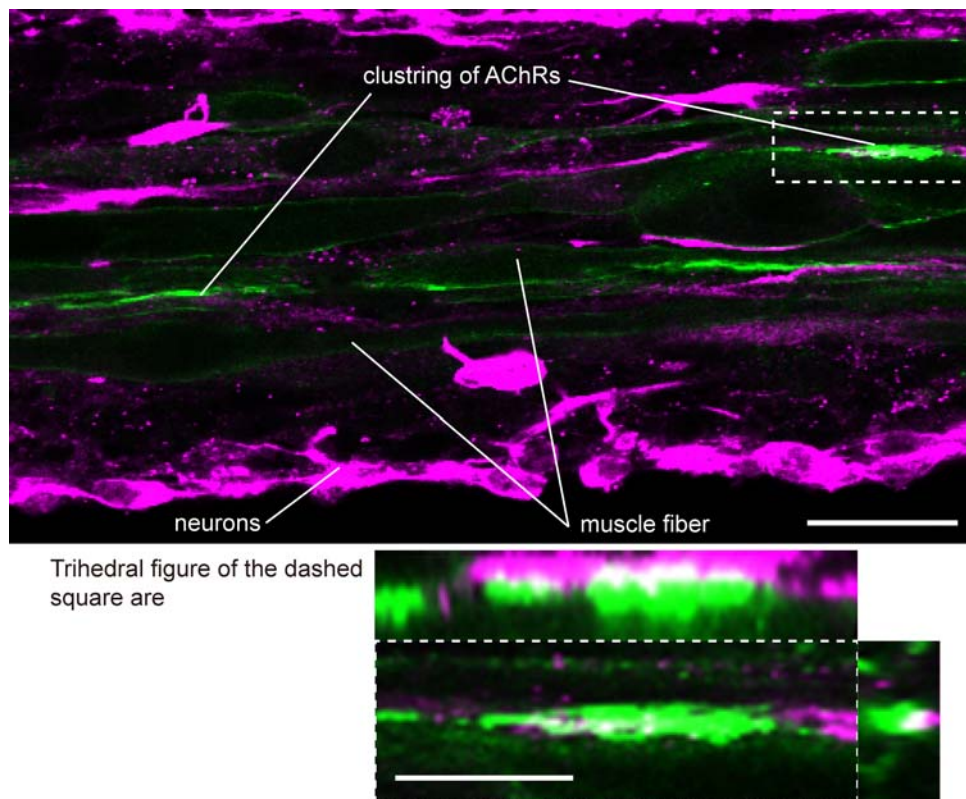


Fig. 4.6 神経-筋肉組織の共焦点画像 (マゼンタ: 神経細胞, 緑: アセチルコリン受容体) (スケールバー: 全体画像 20 μm , 三面画像 10 μm) (©2013 Elsevier)

肉組織の収縮の観察結果を **Fig. 4.7(a)** に示す. 神経刺激により発生した神経-筋肉組織の収縮量は平均 37.7 μm であり, 神経-筋肉組織の自発的収縮の収縮量である平均 0.9 μm より大きかった. また, 個別の骨格筋線維が収縮する自発的収縮とは異なり, グルタミン酸溶液の添加により発生した収縮は神経-筋肉組織内の骨格筋線維が全体として同調して駆動している様子が観察された. 神経と共培養していない骨格筋線維束ではグルタミン酸溶液の添加による収縮が発生しないことから (**Fig. 4.7(b)**), 神経-筋肉組織においてグルタミン酸溶液の添加により発生した収縮は運動ニューロンから発生した神経伝達物質が骨格筋線維に伝わり発生したと推測される. また, 筋弛緩剤の一種であり, アセチルコリン受容体の活動を阻害するクラレ (50 μM) を神経-筋肉組織にかけると, 神経-筋肉組織の痙攣が発生した (**Fig. 4.7(c)**). 痙攣が停止した後はグルタミン酸溶液を添加しても, 神経-筋肉組織は収縮することはなかった (**Fig. 4.7(d)**). この結果は, 神経-筋肉組織内の神経筋接合部でクラレによるアセチルコリン受容体の阻害が行われていると考えられる. 以上の結果は, 神経-筋肉組織の

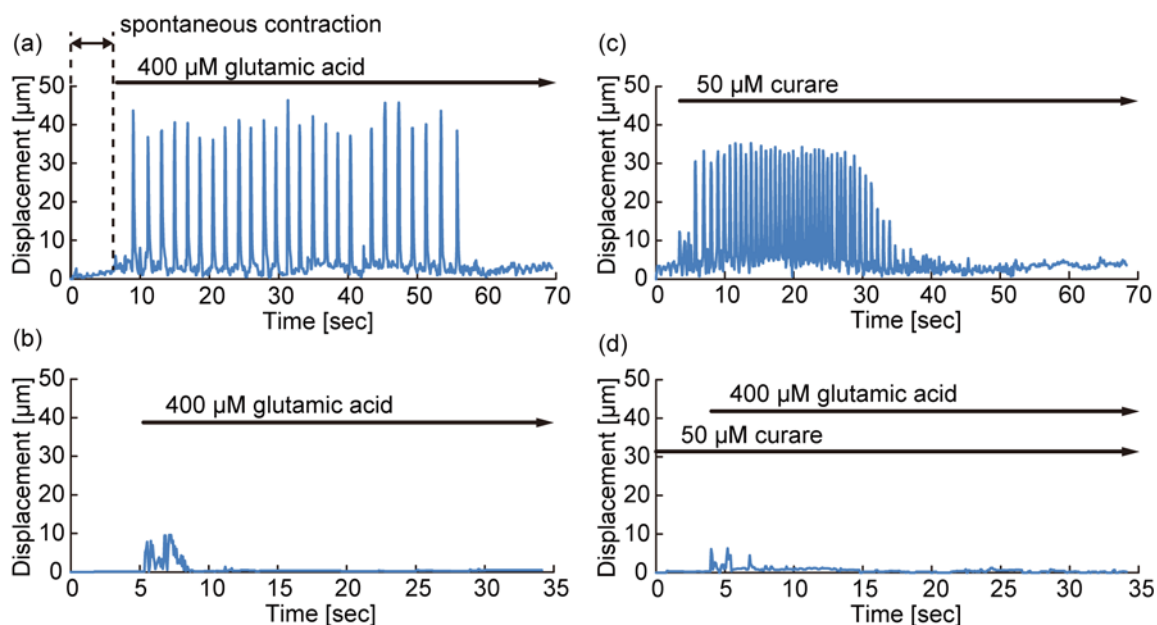


Fig. 4.7 神経－筋肉組織 (a, c, d) と骨格筋線維束 (b) の収縮量 (a, b) グルタミン酸溶液による刺激 (c) クラールレによる刺激 (d) クラールレを添加した後の、グルタミン酸溶液による刺激 (©2013 Elsevier)

収縮が神経筋接合部を通して供給される神経伝達物質により制御されていることが示唆している。

骨格筋線維束の作製に使用する PDMS スタンプの寸法が神経－筋肉組織の特性に影響するかどうかを調べるために、幅広の PDMS スタンプと細幅の PDMS スタンプを用いた時の収縮特性を比較した。神経－筋肉組織の収縮はグルタミン酸溶液を用いた刺激によって引き起こされるが、幅広の PDMS スタンプ (幅・高さともに 750 μm 以上) を用いて作製した骨格筋線維束を基にした神経－筋肉組織の収縮を観察することはできなかった。4.2.2 項に記載の RT-PCR の結果より PDMS スタンプの寸法に限らず *Hlx9* が発現していることから、幅広の PDMS スタンプを用いて作製された神経－筋肉組織でも運動ニューロンは存在し、神経筋接合部の構築に使用されていると考えられる。しかしながら、3.2.2 項と 3.2.4 項より幅広の PDMS スタンプを用いると作製された骨格筋線維束は短く整列していないため、骨格筋線維の収縮方向はランダムであり収縮量は少ないと思われる。そのため、幅広の PDMS スタンプを用いて作製した骨格筋線維束を基にした神経－筋肉組織の収縮を観察することはできなかったと思われる。一方、細幅の PDMS スタンプ (幅・高さともに 500 μm) を用いて作製した骨格筋線

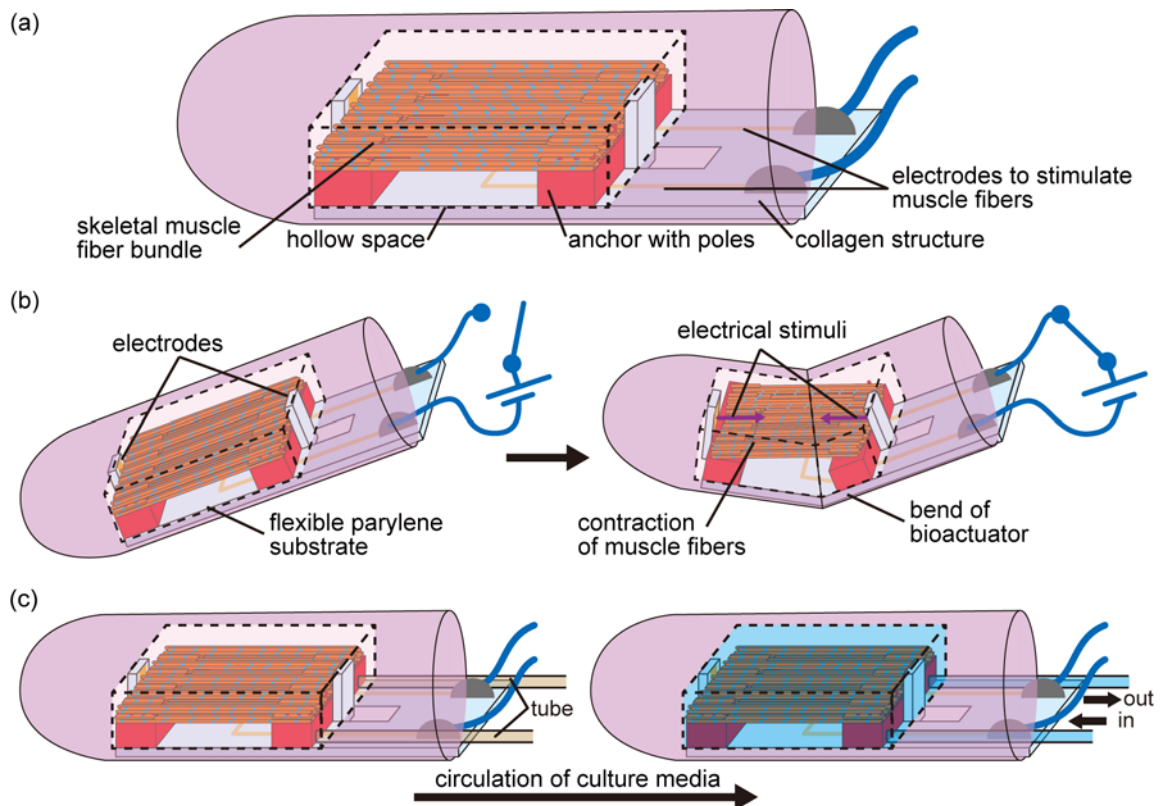


Fig. 4.8 (a) 空气中で駆動可能な骨格筋アクチュエータ概念図 (b) アクチュエータの屈曲状態概念図 (c) アクチュエータ内への培養液灌流の概念図 (©2013 IEEE)

維束を基にした神経-筋肉組織の収縮は、骨格筋線維の収縮方向が同一であり収縮量も大きくなると考えられるため、収縮を観察できたと思われる。以上の考察より、神経-筋肉組織の収縮量の観察には骨格筋線維が長く整列した骨格筋線維束を用いることが重要であり、そのような骨格筋線維束の作製に細幅のPDMSスタンプを用いた手法は適していると思われる。

以上の結果より、本神経-筋肉組織は神経刺激で発生した骨格筋線維束の収縮特性を評価するための体外モデルとして、病理学や薬物動態の試験に応用可能であると考えられる。さらに、神経または筋肉を意図的に変性させることにより、病気の神経筋接合部を構築することが可能となり、様々な病態モデルを構築できると考えられる。加えて、作製された神経-筋肉組織は、神経刺激によって活動可能な駆動素子としてバイオロボティクスの分野や、埋め込み用素材として移植医療分野への応用も可能であると考えている。

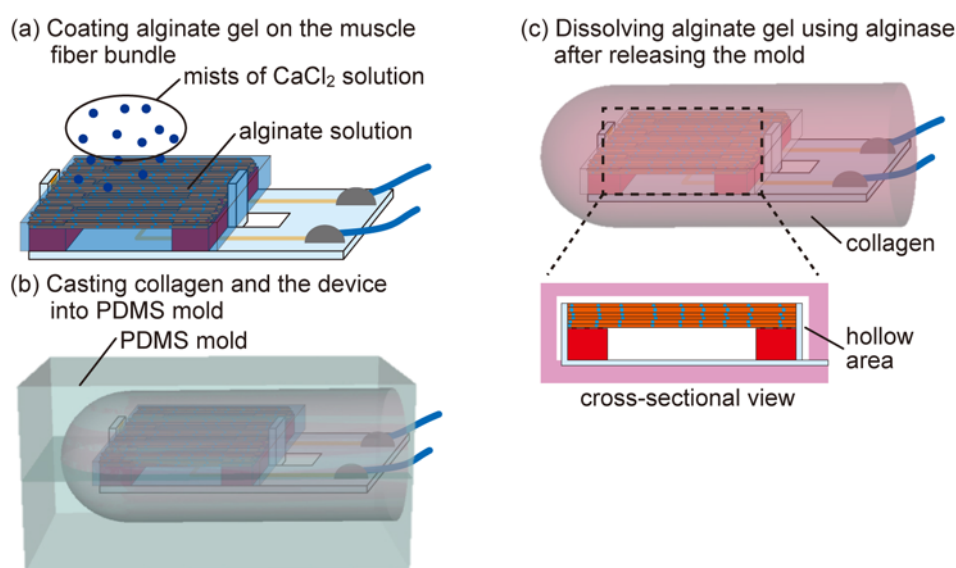


Fig. 4.9 アクチュエータの構築方法 (a) アルギン酸カルシウムゲルへ骨格筋線維束の包埋 (b) コラーゲン構造の構築 (c) アルギン酸ゲルの溶解による中空部分の構築 (©2013 IEEE)

4.2.4 骨格筋線維束のコラーゲン構造への包埋

骨格筋線維束を中空部分を有したコラーゲン構造中に包埋し、空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータを構築した (Fig. 4.8(a)). 本アクチュエータではコラーゲン構造中に骨格筋線維束があるため、空気中であっても骨格筋線維束は湿潤環境を維持し続けられる。また、3.4.1項に記載した骨格筋アクチュエータをコラーゲン構造中に包埋してあるため、空気中であってもコラーゲン構造の中空部分内で電気刺激が流れて骨格筋線維束を収縮させることが可能となる (Fig. 4.8(b)). この骨格筋線維束の収縮によってコラーゲン構造を変形させることで、アクチュエータの屈曲が実現する。加えて、チューブ末端をコラーゲン構造の中空部分に配置し、培養液を流れるようにすることで灌流できるようになる (Fig. 4.8(b)). 以下に具体的な骨格筋線維束を中空部分を有したコラーゲン構造中に包埋する方法について記述する。

コラーゲン構造内の中空部分に骨格筋線維束を包埋したアクチュエータを構築するために、アルギン酸ゲルを犠牲層として利用した。まず、3.4.1項の方法を用いて骨格筋アクチュエータを構築する。本骨格筋アクチュエータ内にてアルギン酸ナトリウム溶液を骨格筋線維束の周囲に添加した後、霧状の塩化カルシウム溶液を噴霧して、骨格筋線維束をアルギン酸カルシウムゲル内に包埋した (Fig. 4.9(a)). 霧状の塩化カルシウム溶液を噴霧することで、ア

ルギン酸ナトリウム溶液が流れることなくアルギン酸カルシウムゲルを構築することができる。次に、PDMS モールドにアルギン酸カルシウムゲルに包埋された骨格筋アクチュエータを配置し、コラーゲン溶液を流入させた (Fig. 4. 9(b)). 30 分間 37°C CO₂ インキュベータ内にて温めることでコラーゲンをゲル化させた後に、PDMS モールドをコラーゲン構造から外した。最後に、アルギナーゼ (40 µl/ml) を溶解した培養液に構造体を浸すことでアルギン酸カルシウムゲルを溶解し、コラーゲン構造内に中空部分を構築した (Fig. 4. 9(c)). コラーゲンゲルは非常に荒い網目 (約 1 -16 µm)^{[113], [114]} を有しているため、溶解されたアルギン酸分子がコラーゲンゲルの外に放出されると考えられる。つまり本方法にて、コラーゲン構造の中空部分において骨格筋線維束の周囲に培養液が満たされたアクチュエータの構築が実現される。

Fig. 4. 10(a) に実際に作製したアクチュエータを示す。骨格筋線維束の周辺部分はコラーゲン層が存在せず、骨格筋線維束は中空部分を有するコラーゲン構造体に覆われていることが確認された。このコラーゲン構造体中における骨格筋線維束の生存確認をするため、Live/Dead 判定試薬を用いて評価した。Fig. 4. 10(b) に生きている細胞が緑、死んでいる細胞が赤に染まるように染色した骨格筋線維束の蛍光画像を示す。この結果が示すようにほぼ全ての細胞が生存していることが確認された。さらに、このアクチュエータを空气中に持ち出しても、水滴の表面張力などで大きく変形することもなく、ある程度培養液中と同じ形状を保てることが分かった (Fig. 4. 10(c)).

また、コラーゲン構造内の中空部分にチューブ端部に配置するためには、まず最初に固定部材近くのパリレン基板上にチューブ端部を光硬化性接着剤で固定した (Fig. 4. 11). その後、このチューブ端部ごとアルギン酸カルシウムゲル内に包埋し、コラーゲンゲルで覆った後にアルギナーゼと反応させることで、コラーゲン構造の中空部分にチューブ端部が配置され、溶液交換可能なアクチュエータが実現された。

4.2.5 空气中におけるアクチュエータの駆動特性

本項においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内) に出版予定) が予定されるため、非公開とする

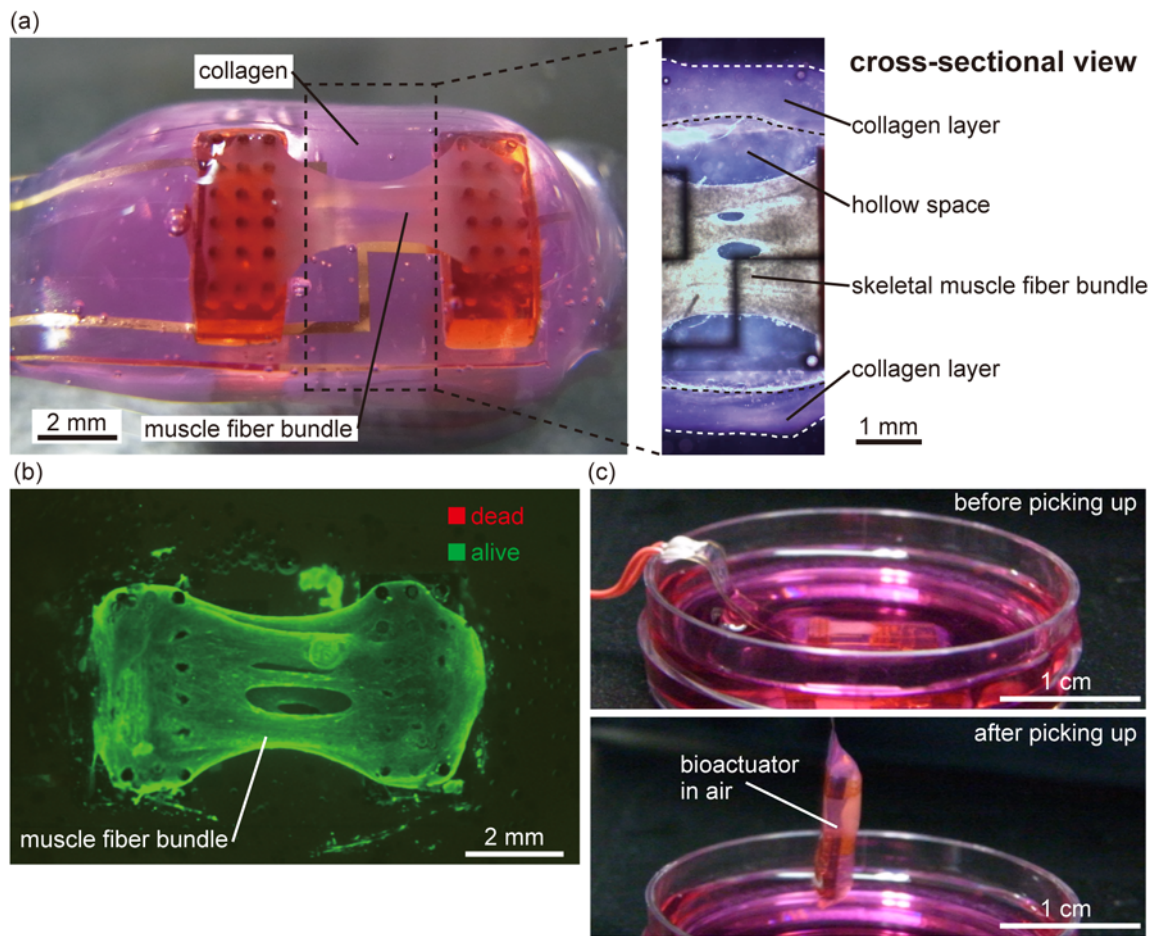


Fig. 4.10 (a) 作製されたアクチュエータの俯瞰写真と断面写真 (b) 骨格筋線維束の生死判定の様子 (c) 培養液からアクチュエータを取り出している様子 (©2013 IEEE)

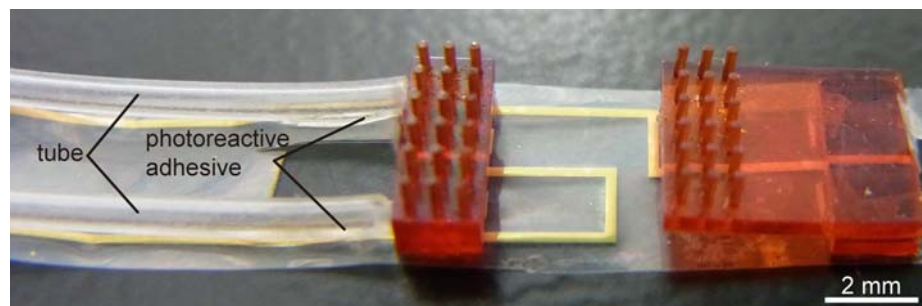


Fig. 4.11 パリレン基板上にチューブ端部を固定した様子

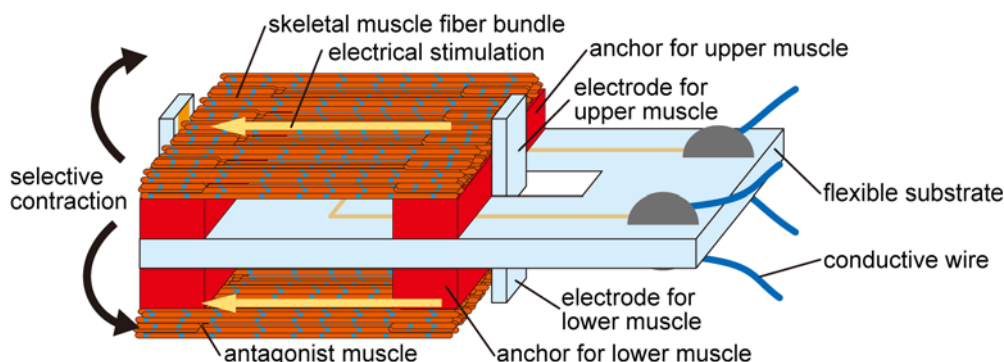


Fig. 4.12 拮抗筋アクチュエータの概念図

4.2.6 アクチュエータによる空気中での仕事

本項においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、非公開とする

4.3 拮抗筋構造を用いた応用検討

4.3.1 拮抗筋構造の構築

主動筋としての骨格筋線維束と拮抗筋としての骨格筋線維束を駆動部を軸として対称に配置し、拮抗筋と主動筋から成る拮抗筋構造をアクチュエータ上に構築した。各々の骨格筋線維束を独立して電気刺激することにより、拮抗筋アクチュエータにおけるそれぞれの骨格筋線維束が選択的に収縮し、2 方向への駆動が実現される。上記の特性を有した拮抗筋アクチュエータを構築するために、2.3.2 項に記載の骨格筋芽細胞を含有したマトリゲルシートを積層する方法を用いて骨格筋線維束を構築した。このシート積層法では、シートを運んで固定部材上の柱に挿すことにより骨格筋線維束の両端を固定するため、シートが運べる範囲であれば任意の位置に骨格筋線維束を配置することが可能となる。そこで、駆動部を軸として固定部材が対称に配置されたデバイスを用意し、そこに筋芽細胞含有マトリゲルシートを積層させた後に培養することで拮抗筋アクチュエータを構築した。各固定部材の両端には電極が配置されており、特定の骨格筋線維束のみ電気刺激可能になっている (Fig. 4.12)。以下に具体的な拮抗筋アクチュエータの構築方法を記述する

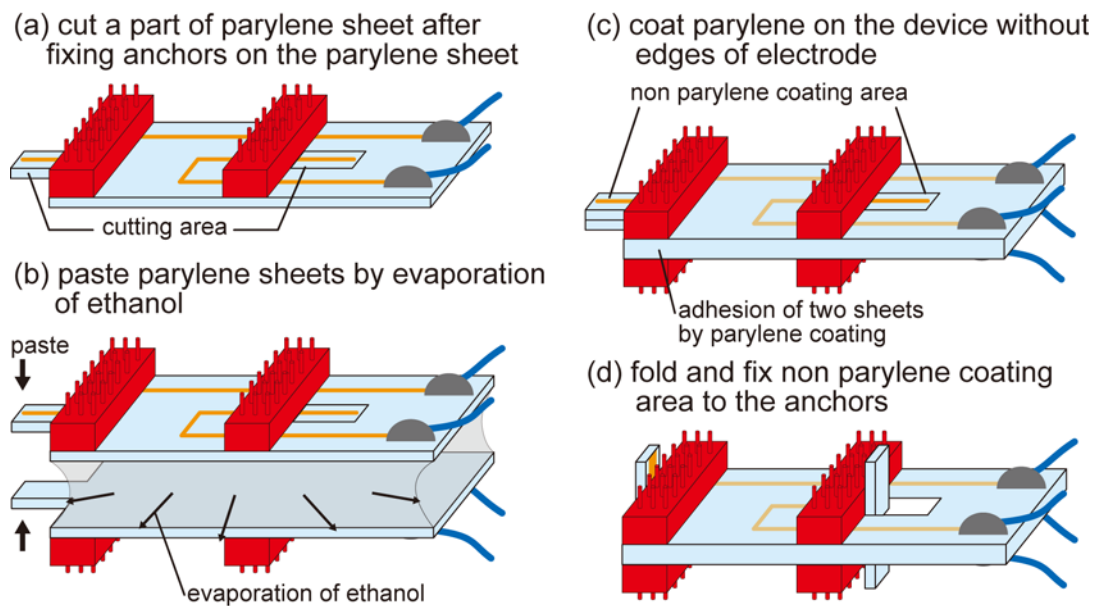


Fig. 4.13 拮抗筋アクチュエータ用の柔軟電極を基板としたデバイスの構築法

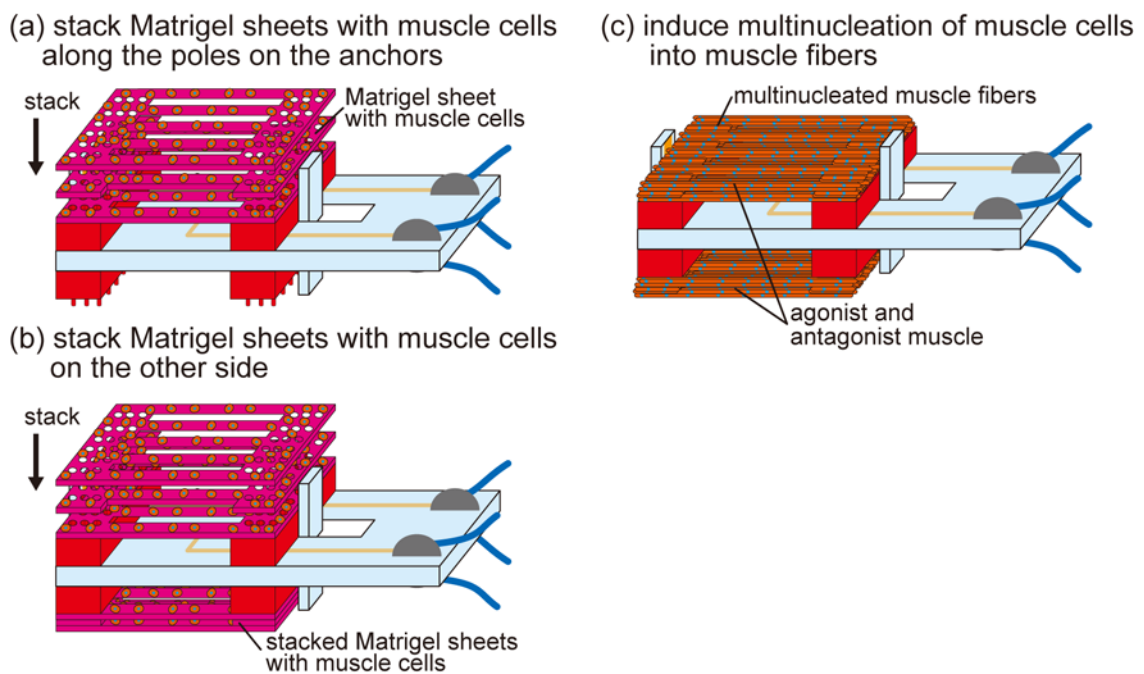


Fig. 4.14 拮抗筋アクチュエータの作製法

拮抗筋アクチュエータの構築にあたり、まず骨格筋線維束を駆動部を軸として対称に固定するためのデバイスを作製した。Fig. 4. 13 にこのデバイスの作製方法を示す。まず、Fig. 2. 8(a)-(c) に示した方法により金電極がパターンニングされたパリレンシートを用意し、導電接着剤を用いた導線の接着と生体適合性のある光硬化性樹脂を用いた固定部材の接着を行った。次に Fig. 4. 13(a) に示した形状にパリレンシートを切断した。この切断後のデバイスを2つ用意し、パリレンシート同士を向かい合わせた状態でパリレンシート間にエタノールを塗布した。このエタノールを蒸発させることにより、パリレンシート同士が凝着し軽い力で2つのデバイスが接着した (Fig. 4. 13(b))。次に、通電させたい金電極部分の表面にシリコーンゴムを貼り付けた後、パリレンの成膜を再度行った。シリコーンゴムの下に置かれた金電極のみパリレンが表面に覆われていないため、シリコーンゴムを外すことによりパリレン非成膜部分とパリレン成膜部分に分けることができた (Fig. 4. 13(c))。最後に、パリレン非成膜部分を固定部材に沿って折り曲げて固定部材との接触面を光硬化性樹脂で固定した (Fig. 4. 13(d))。光硬化性樹脂が絶縁体として働くため、固定部材の傍にある電極のみ通電可能となっている。

上記方法で作製したデバイスに骨格筋線維束を構築した。まず Fig. 2. 7(a, b) に記載の方法で構築した筋芽細胞含有のマトリゲルシートを片面に積層した (Fig. 4. 14(a))。積層したシートが固定部材から外れないように押さえながらデバイスをひっくり返して、シャーレの底に積層されたマトリゲルシートを押し付けるように置くことで、拮抗筋アクチュエータを作製している間にマトリゲルシートが外れないようにした。この状態において、デバイスのもう一方の片面に筋芽細胞含有のマトリゲルシートを積層させた (Fig. 4. 14(b))。最後に多核化用培地で培養して筋芽細胞を多核化させることにより、パリレンシートが駆動部として屈曲し、その屈曲部を軸として対称になるような骨格筋線維束の配置が実現された (Fig. 4. 14(c))。

作製された拮抗筋アクチュエータ用のデバイスを Fig. 4. 15(a) に示す。提案の方法によって、柔軟電極基板を軸として固定部材を対称に配置することに成功した。また、エタノールの蒸発による凝着とパリレンの再成膜によってパリレンシート同士を貼り合わせているため、パリレン以外の物質が屈曲部には存在せずに構築できている。接着剤等を使用してパリレンシート同士を接着すると、接着剤の硬さがデバイスの屈曲が阻害される。本方法で作製したデバイスの屈曲部はパリレンのみで出来ているため、柔軟に屈曲することが可能になっている。Fig. 4. 15(b) に拮抗筋アクチュエータ用デバイス上で骨格筋線維束を培養している様子を示す。この結果より、提案の方法によって筋芽細胞含有のマトリゲルシートをパリレンシートを軸として対称に配置することが可能となり、骨格筋線維への多核化を進めることで

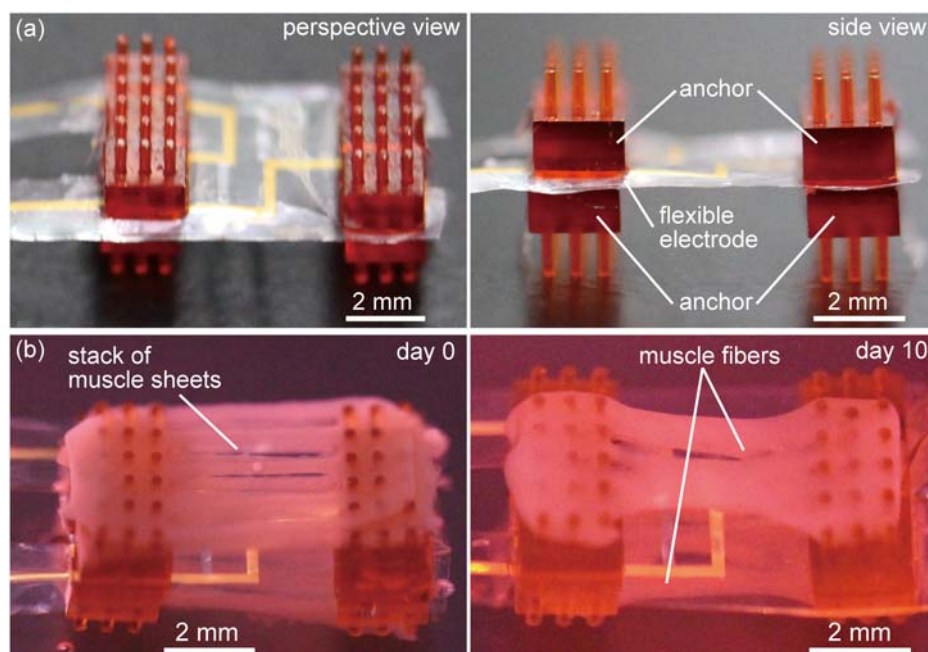


Fig. 4.15 (a) 拮抗筋アクチュエータ用デバイス (b) 拮抗筋アクチュエータ上での骨格筋線維束培養の様子

軸対称の位置に骨格筋線維束が構築できることが分かる。両方の骨格筋線維束とも端部のみが固定部材に固定されており、自由に収縮できるようになっている。

本部分においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、また特許申請が関わるため非公開とする

4.3.2 骨格筋線維束の選択的駆動

4.3.3 リンク機構を有する拮抗筋アクチュエータ

4.3.4 リンク機構を有する腱様構造付き拮抗筋アクチュエータ

本項においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、また特許申請が関わるため非公開とする

4.4 結言

本節においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、また特許申請が関わるため非公開とする

第 5 章 結論

5.1 結論

本研究では、筋芽細胞含有マトリゲルシートの積層による、収縮性を有する任意の位置に配置可能な骨格筋線維束の構築方法を提案した。提案の方法で骨格筋線維束を駆動部に対して対称の位置に配置することで拮抗筋構造をアクチュエータ上で実現し、骨格筋線維束の収縮・伸展運動が体外で実現可能であることを示した。加えて、単一骨格筋線維束を用いて、神経刺激で駆動する神経-筋肉組織と空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータを実現し、提案した骨格筋線維束が薬物動態モデルから生体組織を駆動源とするバイオアクチュエータまで幅広い応用可能性を有していることを示した。

骨格筋線維束の構築において、PDMS スタンプを用いて筋芽細胞含有マトリゲル構造の幅と高さを制御することで、骨格筋線維長・配向度・成熟度・単位断面積当たりの収縮力を調整可能である。このとき、マトリゲル構造の幅と高さを小さくすることで、骨格筋線維長・配向度・成熟度・単位断面積当たりの収縮力を向上させることができる。この特性により、筋芽細胞含有の細幅マトリゲル構造を並列させたマトリゲルシートを積層することで、細幅マトリゲル構造の 3 次元アレイ化が実現されるため、収縮性の高い骨格筋線維束を構築することができる。また、本方法を用いることでシートを積層できる場所であれば、屈曲可能なデバイス上など任意の位置に骨格筋線維束を構築することが可能になる。パリレンシートを用いて作製された固定部材付き柔軟電極基板上に骨格筋線維束を配置することで、骨格筋線維束を培養液中で選択的に電気刺激可能となる。電気刺激により発生した骨格筋線維束の収縮により、柔軟電極基板の変形が引き起こされる。しかし、柔軟電極基板が骨格筋線維束の

収縮力で変形できるほど柔らかいと、骨格筋線維束の短縮が起こり 2 日後には骨格筋線維束の収縮性が喪失する。この結果より、骨格筋線維束の継続的な収縮性の維持には、培養期間中骨格筋線維束の張力と同等の抗力を常にかけて続ける必要があることが確認された。

提案の方法で作製した骨格筋線維束は、神経細胞との共培養により骨格筋線維上に神経筋接合部を再構築し、神経刺激による骨格筋線維の収縮が可能となる。本神経-筋肉組織は神経筋接合部に関連する病態モデルとして、創薬分野への応用が考えられる。また、中空部分を有するコラーゲン構造に骨格筋線維束を埋め込むことにより、空気中における活性維持が可能となり収縮運動を行うことができる。本方法を用いることで、培養皿外における骨格筋線維束の応用可能性が高まり、生体エネルギーで駆動可能な骨格筋アクチュエータとしての発展が期待できる。

本部分においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が予定されるため、非公開とする。

5.2 今後の展望

本研究では、筋芽細胞を含有したマトリゲルシートの積層により骨格筋線維束を構築した。使用する PDMS スタンプによってマトリゲルシートの形状は自由に変えられる。加えて、積層するマトリゲルシートの枚数も固定部材上の柱の長さを変えることで変更可能である。シートの形状と積層枚数を調整することにより、作製する骨格筋線維束の幅と高さを制御することができ、任意の収縮性を有する骨格筋線維束を構築可能であると考えられる。従って、シート長を長くし、積層するシートの枚数を増やすことで、収縮性の高い骨格筋線維束が構築できることが期待される。また、デバイスの構造を適切に変更することで、大きく駆動する骨格筋アクチュエータも構築可能であると考えられる。

体外で構築された骨格筋線維束は薬物動態試験などに用いることが期待される。提案の拮抗筋アクチュエータに薬物を与えた時の収縮性を比較することにより、薬物に対する反応性を評価できると考えられる。拮抗筋アクチュエータの収縮性には、骨格筋線維束の粘弾性要素も影響するため、従来の骨格筋線維束の評価系よりも生体现象の再現性が高まることが期待できる。加えて、神経-筋肉組織は、神経筋接合部由来の骨格筋線維束の薬物動態試験に用いることができると考えられる。また、空気中で駆動可能な骨格筋アクチュエータにおいては、コラーゲン構造表面に細胞を培養することができるため、表皮細胞も表面で培養できると考えている。表皮細胞をコラーゲン構造表面に接着させた状態でアクチュエータを空気中へ持ち出すと、表皮細胞を気液界面に置くことができる。気液界面で培養された表皮細

胞は角化を引き起こし、アクチュエータ表面に水分を弾くことが可能な表皮を構築することができると考えている。表皮付きアクチュエータを用いることで、表皮を通した骨格筋線維束の薬物動態試験も可能になると予想できる。

本研究成果を用いることで、薬物動態試験だけでなく移植用の埋め込み素材としても応用が期待される。筋芽細胞を骨格筋の欠損部分に移植しても生着せず、骨格筋線維を移植すると生着しやすくなるということが知られている。提案の方法により骨格筋線維束の活性を高めることができるため、移植用の素材として適した骨格筋線維束であると考えられる。加えて、神経-筋肉組織は既に神経筋接合部が設けられているため、神経-筋肉組織上の神経と生体の神経を接続させる方法が解明できれば、埋め込み後に随意・非随意に関わらず生体反応によって動かせるようになることが期待できる。また、血管細胞と共培養した骨格筋線維束の構築方法について既に報告があり、その手法を用いることで血管細胞を有する骨格筋線維束が構築可能となる。本研究ではチューブを用いて培養液を供給させていたが、血管細胞と骨格筋線維束と共培養させ、移植後に生体の毛細血管と作製された血管が結合されることができれば、血流が供給できると考えている。このように、提案の骨格筋線維束と神経細胞との共培養に加えて、将来血管細胞や皮膚細胞との共培養を実現することにより、様々な機能を有する組織を生体外で構築できると考えている。また、本論文で提案の骨格筋線維束は、細胞の種類を変更しても同様の収縮特性を有していることが示唆されている。そのため、iPS細胞から分化した筋芽細胞でも同じような骨格筋線維束や骨格筋アクチュエータを構築できると考えられる。自分のiPS細胞から骨格筋線維束を構築することで、自家移植などに用いることができるようになると考えられる。ただし、現在のiPS細胞から分化した細胞は一般的には生体の細胞と同等の機能を発生することができないと言われている。効率的な自家移植の方法としてiPS細胞から作製した骨格筋線維束を用いるには、分化細胞の機能発現が効果的になされるのが必要不可欠である。

提案の骨格筋線維束はバイオロボティクスに応用することも期待される。骨格筋を電気刺激または神経刺激によって駆動可能なリニアアクチュエータとして用いることで、生体ロボットの駆動源として扱えることができると考えられる。また、提案の方法では任意の位置に骨格筋線維束が構築可能であり、拮抗筋付き骨格筋アクチュエータのように2つの筋肉を配置するだけでなく、もっと多くの骨格筋線維束をデバイス上に構築できると考えられる。デバイスの変形箇所の増加やボールジョイントを用いることにより、多関節の骨格筋アクチュエータや捻り運動が可能なアクチュエータが構築でき、さらなる生体運動の模倣が可能になると期待できる。これら全ての骨格筋アクチュエータは、提案の方法にてコラーゲン構

結論

造に包埋することができると考えている。それにより、長期間の空気中での駆動も実現することが可能となり、様々な仕事を骨格筋線維束を駆動源として達成することが期待できる。

参考文献

- [1] D. R. Albrecht, G. H. Underhill, T. B. Wassermann, R. L. Sah and S. N. Bhatia, “Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments”, *Nature Method*, 2006;3:369-375.
- [2] F. Pampaloni, E. G. Reynaud and E. H. K. Stelzer, “The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue”, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007;8:839-845.
- [3] T. Taguchi, “Assembly of cells and vesicles for organ engineering”, *Science and Technology of Advanced Materials*, 2011;12:064703.
- [4] B. G. Chung, K.-H. Lee, A. Khademhosseini and S.-H. Lee, “Microfluidic fabrication of microengineered hydrogels and their application in tissue engineering”, *Lab on a Chip*, 2011;12:45-59.
- [5] H. Liao and G. Q. Zhou, “Development and Progress of Engineering of Skeletal Muscle Tissue”, *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 2009;15:319-331.
- [6] A. D. Bach, J. P. Beier, J. Stern-Staeter and R. E. Horch, “Skeletal muscle tissue engineering”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2004;8:413-422.
- [7] V. Kroehne, I. Heschel, F. Schugner, D. Lasrich, J. W. Bartsch and H. Jocksch, “Use of a novel collagen matrix with oriented pore structure for muscle cell differentiation in cell culture and in grafts”, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2008;12:1640-1648.
- [8] P. D. Edelman, D. C. McFarland, V. A. Mironov and J. G. Matheny, “*In Vitro*-Cultured Meat Production”, *Tissue Engineering*, 2005;11:659-662.
- [9] M. L. P. Langelaan, K. J. M. Boonen, R. B. Polak, F. P. T. Baaijens, M. J. Post and D. W. J. van der Schaft, “Meet the new meat: tissue engineered skeletal muscle”, *Trends in Food Science & Technology*, 2010;21:59-66.
- [10] Z. F. Bhat and H. Bhat, “Tissue engineered meat- Future meat”, *Journal of Stored Products and Postharvest Research*, 2011;2:1-10.
- [11] I. W. Hunter and S. Lafontaine, “A Comparison of Muscle with Artificial Actuators”, *IEEE 5th Solid-State Sensor and Actuator Workshop*, 1992;178-184.
- [12] 中村太郎, “図解 人工筋肉 ソフトアクチュエータが拓く世界”, 日刊工業新聞社, 2011.

- [13] P. L. Andres, L. M. Skerry, T. L. Munsat, B. J. Thornell, J. Szymonifka, D. A. Schoenfeld, M. E. Cudkowicz, “Validation of a new strength measurement device for amyotrophic lateral sclerosis clinical trials”, *Muscle and Nerve*, 2012;45:81-85.
- [14] R. L. Lieber and J. Friden, “Functional and clinical significance of skeletal muscle architecture”, *Muscle and Nerve*, 2000;23:1647-1666.
- [15] F. L. Martini, J. L. Nath and E. F. Bartholomew, “Fundamentals of Anatomy & Physiology”, Benjamin Cummings, 2012
- [16] K. Nagamine, T. Kawashima, T. Ishibashi, H. Kaji, M. Kanzaki and M. Nishizawa, “Micropatterning Contractile C₂C₁₂ Myotubes Embedded in a Fibrin Gel”, *Biotechnology and Bioengineering*, 2010;105:1161-1167.
- [17] Y. Yamamoto, A. Ito, H. Fujita, E. Nagamori, Y. Kawabe, and M. Kamihira, “Functional Evaluation of Artificial Skeletal Muscle Tissue Constructs Fabricated by a Magnetic Force-Based Tissue Engineering Technique”, *Tissue Engineering Part A*, 2011;17:107-114.
- [18] H. Vandenburg, J. Shansky, F. Benesch-Lee, V. Barbata, J. Reid, L. Thorrez, R. Valentini and G. Crawford, “Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle”, *Muscle and Nerve*, 2008;37:438-447.
- [19] M. S. Sakar, D. Neal, T. Boudou, M. A. Borochin, Y. Li, R. Weiss, R. D. Kamm, C. S. Chen and H. H. Asada, “Formation and optogenetic control of engineered 3D skeletal muscle bioactuators”, *Lab on a Chip*, 2012;12:4976-4985.
- [20] 橋本健志, 山崎先也, 小河繁彦, 千家弘行, 田口貞善, “後肢テノトミー処置後の模擬無重力下で観られる骨格筋萎縮に伴う組織化学的特性およびミオシン重鎖愛想フォーム発現の変化”, *日生誌*, 2001;63:252-260
- [21] H. Fujita, V. T. Dau, K. Shimizu, R. Hatsuda, S. Sugiyama and H. Nagamori, “Designing of a Si-MEMS device with an integrated skeletal muscle cell-based bio-actuator”, *Biomedical Microdevices*, 2011;13:123-129.
- [22] K. Kabumoto, T. Hoshino, Y. Akiyama and K. Morishima, “Voluntary Movement Controlled by the Surface EMG Signal for Tissue-Engineered Skeletal Muscle on a Gripping Tool”, *Tissue Engineering Part A*, 2013;19:1695-1703.
- [23] K. Nagamine, T. Kawashima, S. Sekine, Y. Ido, M. Kanzaki and M. Nishizawa, “Spatiotemporally controlled contraction of micropatterned skeletal muscle cells on a hydrogel sheet”, *Lab on a Chip*, 2011;11:513-517.

- [24] W. Yan, S. Geroge, U. Fotadar, N. Tyhovych, A. Kamer, M. J. Yost, R. L. Price, C. R. Haggart, J. W. Holmes and L. Terracio, "Tissue engineering of skeletal muscle", *Tissue Engineering*, 2007;13:2781-2790.
- [25] R. G. Dennis and P. E. Kosnik, "Excitability and isometric contractile properties of mammalian skeletal muscle constructs engineered in vitro", *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 2000;36:327-335.
- [26] P. E. Kosnik, J. A. Faulkner and R. G. Dennis, "Functional development of engineered skeletal muscle from adult and neonatal rats", *Tissue Engineering*, 2001;2807:573-584.
- [27] Y.-C. Huang, R. G. Dennis, L. Larkin and K. Baar, "Rapid formation of functional muscle in vitro using fibrin gels", *Journal of Applied Physiology*, 2005;98:706-713.
- [28] H. Fujita, K. Shimizu and E. Nagamori, "Novel Method for Fabrication of Skeletal Muscle Construct From the C2C12 Myoblast Cell Line Using Serum-Free Medium AIM-V", *Biotechnology and Bioengineering*, 2009;103:1034-1041.
- [29] M. T. Lam, Y.-C. Huang, R. K. Birla and S. Takayama, "Microfeature guided skeletal muscle tissue engineering for highly organized 3-dimensional free-standing constructs", *Biomaterials*, 2009;30:1150-1155.
- [30] H. Fujita, K. Shimizu, Y. Yamamoto, A. Ito, M. Kamihira and E. Nagamori, "Fabrication of scaffold-free contractile skeletal muscle tissue using magnetite-incorporated myogenic C2C12 cells", *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2010;4:437-443.
- [31] H. Vandenburg, "High-Content Drug Screening with Engineered Musculoskeletal Tissues", *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 2010;16:55-64.
- [32] A. Khodabukus and K. Baar, "Defined Electrical Stimulation Emphasizing Excitability for the Development and Testing of Engineered Skeletal Muscle", *Tissue Engineering Part C-Methods*, 2012;18:349-357.
- [33] M. Sato, A. Ito, H. Akiyama, Y. Kawabe and M. Kamihira, "Effects of B-Cell Lymphoma 2 Gene Transfer to Myoblast Cells on Skeletal Muscle Tissue Formation Using Magnetic Force-Based Tissue Engineering", *Tissue Engineering Part A*, 2013;19:307-315.
- [34] N. R. W. Martin, S. L. Passey, D. J. Player, A. khodabukus, R. A. Ferguson, A. P. Sharples, V. Mudera, K. Baar and M. P. Lewis, "Factors affecting the structure and maturation of human tissue engineered skeletal muscle", *Biomaterials*, 2013;34:5759-5765.

- [35] H. H. Vandeburgh, P. Karlisch and L. Farr, "Maintenance of Highly Contractile Tissue-Cultured Avian Skeletal Myotubes in Collagen Gel", *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 1988;24:166-174.
- [36] C. A. Powell, B. L. Smiley, J. Mills and H. H. Vandeburgh, "Mechanical stimulation improves tissue-engineered human skeletal muscle", *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 2002;283:C1557-C1565.
- [37] Y. A. Song, R. Melik, A. N. Rabie, A. M. Ibrahim, D. Moses, A. Tan, J. Han and S. J. Lin, "Electrochemical activation and inhibition of neuromuscular systems through modulation of ion concentrations with ion-selective membranes", *Nature Materials*, 2011;10:980-986.
- [38] 山崎健一, 赤土和也, 林宏行, 寺田堂彦, 近藤英雄, 筒井博司, 藤里俊哉, "無細胞生体由来組織とコラーゲンを足場と舌培養骨格筋を用いたバイオアクチュエータの開発", *生体医工学*, 2008;46:690-697.
- [39] Y. Yamamoto, A. Ito, M. Kato, Y. Kawabe, K. Shimizu, H. Fujita, E. Nagamori and M. Kamihira, "Preparation of artificial skeletal muscle tissues by a magnetic force-based tissue engineering technique", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2009;108:538-543.
- [40] Y. Akiyama, R. Terada, M. Hashimoto, T. Hoshino, Y. Furukawa and K. Morishima, "Rod-shaped Tissue Engineered Skeletal Muscle with Artificial Anchors to Utilize as a Bio-Actuator", *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2010;5:236-244.
- [41] S. Hinds, W. Bian, R. G. Dennis and N. Bursac, "The role of extracellular matrix composition in structure and function of bioengineered skeletal muscle", *Biomaterials*, 2011;32:3575-3583.
- [42] A. S. T. Smith, S. Passey, L. Greensmith, V. Mudera and M. P. Lewis, "Characterization and optimization of a simple, repeatable system for the long term in vitro culture of aligned myotubes in 3D", *Journal of Cellular Biochemistry*, 2012;113:1044-1053.
- [43] W. Bian and N. Bursac, "Engineered skeletal muscle tissue networks with controllable architecture", *Biomaterials*, 2009;30:1401-1412.
- [44] W. Bian, M. Juhas, T. W. Pfeiler and N. Bursac, "Local Tissue Geometry Determines Contractile Force Generation of Engineered Muscle Networks", *Tissue Engineering Part A*, 2012;18:957-967.
- [45] T. Neumann, S. D. Hauschka and J. E. Sanders, "Tissue engineering of skeletal muscle using polymer fiber arrays", *Tissue Engineering*, 2003;9:995-1003.
- [46] N. F. Huang, S. Patel, R. G. Thakar, J. Wu, B. S. Hsiao, B. Chu, R. J. Lee and S. Li, "Myotube assembly on nanofibrous and micropatterned polymers", *Nano Letters*, 2006;6:537-542.

- [47] T. Matsumoto, J. I. Sasaki, E. Alsberg, H. Egusa, H. Yatani and T. Sohmura, “Three-Dimensional Cell and Tissue Patterning in a Strained Fibrin Gel System”, *Plos ONE*, 2007;2:e1211.
- [48] I.-C. Liao, J. B. Liu, N. Bursac and K. W. Leong, “Effect of Electromechanical Stimulation on the Maturation of Myotubes on Aligned Electrospun Fibers”, *Cellular and Molecular Bioengineering*, 2008;1:133-145.
- [49] E. D. F. Ker, A. S. Nain, L. E. Weiss, J. Wang, J. Suhan, C. H. Amon and P. G. Campbell, “Bio-printing of growth factors onto aligned sub-micron fibrous scaffolds for simultaneous control of cell differentiation and alignment”, *Biomaterials*, 2011;32:8097-8107.
- [50] M.-C. Chen, Y.-C. Sun and Y.-H. Chen, “Electrically conductive nanofibers with highly oriented structures and their potential application in skeletal muscle tissue engineering”, *Acta Biomaterialia*, 2013;9:5562-5572.
- [51] M. J. O Wakelam, “The Fusion of Myoblasts”, *Biochemical Journal*, 1985;228:1-12.
- [52] D. L. Yamamoto, R. I. Csikasz, Y. Li, G. Sharma, K. Hjort, R. Karlsson and T. Bengtsson, “Myotube formation on micro-patterned glass: Intracellular organization and protein distribution in C2C12 skeletal muscle cells”, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2008;56:881-892.
- [53] K. Shimizu, H. Fujita and E. Nagamori, “Alignment of Skeletal Muscle Myoblasts and Myotubes Using Linear Micropatterned Surfaces Ground With Abrasives”, *Biotechnology and Bioengineering*, 2009;103:631-638.
- [54] P.-Y. Wang, H.-T. Yu and W.-B. Tsai, “Modulation of Alignment and Differentiation of Skeletal Myoblasts by Submicron Ridges/Grooves Surface Structure”, *Biotechnology and Bioengineering*, 2010;106:285-294.
- [55] H. Aubin, J. W. Nichol, C. B. Hutson, H. Bae, A. L. Sieminski, D. M. Cropek, P. Akhyari and A. Khademhosseini, “Directed 3D cell alignment and elongation in microengineered hydrogels”, *Biomaterials*, 2010;31:6941-6951.
- [56] S. L. Hume, S. M. Hoyt, J. S. Walker, B. V. Sridhar, J. F. Ashley, C. N. Bowman and S. J. Bryant, “Alignment of multi-layered muscle cells within three-dimensional hydrogel macrochannels”, *Acta Biomaterialia*, 2012;8:2193-2202.
- [57] V. Hosseini, S. Ahadian, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, S. Chen, H. Kaji, M. Ramalingam and A. Khademhosseini, “Engineered Contractile Skeletal Muscle Tissue on a Microgrooved Methacrylated Gelatin Substrate”, *Tissue Engineering Part A*, 2012;18:2453-2465.

- [58] I. E. Palama, S. D'Amone, A. M. L. Coluccia and G. Gigli, "Micropatterned polyelectrolyte nano-films promote alignment and myogenic differentiation of C2C12 cells in standard growth media", *Biotechnology and Bioengineering*, 2013;110:586-596.
- [59] S. Ahadian, J. Ramon-Azcon, S. Ostrovidov, G. Camci-Unal, H. Kaji, K. Ino, H. Shiku, A. Khademhosseini and T. Matsue, "A contactless electrical stimulator: application to fabricate functional skeletal muscle tissue", *Biomedical Microdevices*, 2013;15:109-115.
- [60] P.-Y. Wang, T.-H. Wu, W.-B. Tsai, W.-H. Kuo and M.-J. Wang, "Grooved PLGA films incorporated with RGD/YIGSR peptides for potential application on skeletal muscle tissue engineering", *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, 2013;110:88-95.
- [61] A. J. Engler, M. A. Griffin, S. Sen, C. G. Bonnetmann, H. L. Sweeney and D. E. Discher, "Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments", *Journal of Cell Biology*, 2004;116:877-887.
- [62] P. Molnar, W. S. Wang, A. Natarajan, J. W. Rumsey and J. J. Hickman, "Photolithographic patterning of C2C12 myotubes using vitronectin as growth substrate in serum-free medium", *Biotechnology Progress*, 2007;23:265-268.
- [63] W. W. Ahmed, T. Wolfman, A. M. Goldyn, K. Bruellhoff, B. A. Rioja, M. Moller, J. P. Spatz, T. A. Saif, J. Groll and R. Kemkemer, "Myoblast morphology and organization on biochemically micro-patterned hydrogel coatings under cyclic mechanical strain", *Biomaterials*, 2010;31:250-258.
- [64] P. Bajaj, B. Reddy, L. Millet, C. N. Wei, P. Zorlutuna, G. Bao and R. Bashir, "Patterning the differentiation of C2C12 skeletal myoblasts", *Integrative Biology*, 2011;3:897-909.
- [65] S. Zatti, A. Zoso, E. Serena, C. Luni, E. Cimetta and N. Elvassore, "Micropatterning Topology on Soft Substrates Affects Myoblast Proliferation and Differentiation", *Langmuir*, 2012;28:2718-2726.
- [66] Y. Sun, R. Duffy, A. Lee and A. W. Feinberg, "Optimizing the structure and contractility of engineered skeletal muscle thin films", *Acta Biomaterialia*, 2013;9:7885-7894
- [67] W. Melzer, E. Rios and M. F. Schneider, "Time Course of Calcium Release and Removal in Skeletal-Muscle Fibers", *Biophysical Journal*, 1984;45:637-641
- [68] H. Herr and R. G. Dennis, "A swimming robot actuated by living muscle tissue", *Journal of neuro-engineering and rehabilitation*, 2004;1:6 (1-9)
- [69] Y. Zhao and X. Zhang, "Cellular mechanics study in cardiac myocytes using PDMS pillars array", *Sensors and Actuators a-Physical*, 2006;125:398-404

- [70] K. Morishima, Y. Tanaka, M. Ebara, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori, "Demonstration of a bio-microactuator powered by cultured cardiomyocytes coupled to hydrogel micropillars", *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2006;119:345-350
- [71] Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori, "Demonstration of a PDMS-based bio-microactuator using cultured cardiomyocytes to drive polymer micropillars", *Lab on a Chip*, 2006;6:230-235
- [72] P. W. Alford, A. W. Feinberg, S. P. Sheehy and K. K. Parker, "Biohybrid thin films for measuring contractility in engineered cardiovascular muscle", *Biomaterials*, 2010;31:3613-3621
- [73] Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori, "An actuated pump on-chip powered by cultured cardiomyocytes", *Lab on a Chip*, 2006;6:362-368
- [74] Y. Tanaka, K. Sato, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori, "A micro-spherical heart pump powered by cultured cardiomyocytes", *Lab on a Chip*, 2007;7:207-212
- [75] J.-Y. Park, I. C. Kim, J.-G. Baek, M.-S. Cha, J.-S. Kim, S.-H. Park, J.-H. Lee and B.-K. Kim "Micro pumping with cardiomyocyte-polymer hybrid", *Lab on a Chip*, 2007;7:1367-1370
- [76] J.-Z. Xi, J. J. Schmidt and C. D. Montemagno, "Self-assembled microdevices driven by muscle", *Nature Materials*, 2005;4:180-184
- [77] J. Kim, J. Park, S. Yang, J. Baek, B. Kim, S. H. Lee, E. S. Yoon, K. Chun and S. Park, "Establishment of a fabrication method for a long-term actuated hybrid cell robot", *Lab on a Chip*, 2007;7:1504-1508
- [78] A. W. Feinberg, A. Feigel, S. S. Shevkoplyas, S. Sheehy, G. M. Whitesides and K. K. Parker, "Muscular thin films for building actuators and powering devices", *Science*, 2007;317:1366-1370
- [79] J. C. Nawroth, H. Lee, A. W. Feinberg, C. M. Ripplinger, M. L. McCain, A. Grosberg, J. O. Dabiri, K. K. Parker, "A tissue-engineered jellyfish with biomimetic propulsion", *Nature Biotechnology*, 2012;30:792-797
- [80] Y. Sun, R. Duffy, A. Lee and A. W. Feinberg, "Optimizing the structure and contractility of engineered skeletal muscle thin films", *Acta Biomaterialia*, 2013;9:7885-7894
- [81] K. Shimizu, H. Sasaki, H. Hida, H. Fujita, K. Obinata, M. Shikida and E. Nagamori, "Assembly of skeletal muscle cells on a Si-MEMS device and their generative force measurement", *Biomedical Microdevices*, 2010;12:247-252

- [82] T. Hoshino and K. Morishima, “Muscle-powered Cantilever for Microtweezers with an Artificial Micro Skeleton and Rat Primary Myotubes”, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, 2010;5:245-251
- [83] V. Witzemann, “Development of the neuromuscular junction”, *Cell and Tissue Research*, 2006;326:263-271
- [84] N. E. Gilhus, “Myasthenia and the neuromuscular junction”, *Current Opinion in Neurology*, 2012;25:523-529
- [85] J. Pal, C. Rozsa, S. Komoly, and Z. Illes, “Clinical and biological heterogeneity of autoimmune myasthenia gravis”, *Journal of Neuroimmunology*, 2011;231:43-54
- [86] L. M. Murray, K. Talbot, and T. H. Gillingwater, “Review: Neuromuscular synaptic vulnerability in motor neurone disease: amyotrophic lateral sclerosis and spinal muscular atrophy”, *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2010;36:133-156
- [87] J. A. Umbach, K. L. Adams, C. B. Gunderse, and B. G. Novitch, “Functional Neuromuscular Junctions Formed by Embryonic Stem Cell-Derived Motor Neurons”, *PLoS ONE*, 2012;7:e36049
- [88] M. Das, J. W. Rumsey, C. A. Gregory, N. Bhargava, J.-F. Kang, P. Molnar, L. Riedel, X. Guo and J. J. Hickman, “Embryonic motoneuron-skeletal muscle co-culture in a defined system”, *Neuroscience*, 2007;146:481-488
- [89] X. Guo, M. Das, J. Rumsey, M. Gonzalez, M. Stancescu, and J. Hickman, “Neuromuscular junction formation between human stem-cell-derived motoneurons and rat skeletal muscle in a defined system”, *Tissue Engineering Part C-Methods*, 2010;16:1347-1355
- [90] M. Das, J. W. Rumsey, N. Bhargava, M. Stancescu, and J. J. Hickman, “A defined long-term in vitro tissue engineered model of neuromuscular junctions”, *Biomaterials*, 2010;31:4880-4888
- [91] N. Hogan, “Adaptive Control of Mechanical Impedance by Coactivation of Antagonist Muscles”, *IEEE Transactions on Automatic Control*, 1984;29:681-690
- [92] 井川達也, 勝平順司, 山本澄子, “高齢者の立位踵上げ運動が歩行 階段昇降時の拮抗筋活動に与える影響”, 第48回日本理学療法学会, 2013;0-A 運動-030
- [93] 御橋廣眞, “筋肉の動きを探る”, 丸善出版株式会社, 1994
- [94] A. F. Huxley, “Muscular-Contraction - Review Lecture”, *Journal of Physiology-London*, 1974;243:1-43

参考文献

- [95] R. W. Ramsey and S. F. Street, “The isometric length-tension diagram of isolated skeletal muscle fibers of the frog”, *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 1940;15:11-34
- [96] A. V. Hill, “The heat of shortening and the dynamic constants of muscle”, *Proceedings of the Royal Society Series B-Biological Sciences*, 1938;126:136-195
- [97] 伊藤宏司, 辻敏夫, “筋骨格系の双線形特性と義肢制御への応用”, *電気学会論文誌*, 1985;105-C:9-16
- [98] S. L. Delp and J. P. Loan, “A computational framework for simulating and analyzing human and animal movement”, *Computing in Science & Engineering*, 2000;2:46-55
- [99] 柳澤輝行, 増宮晴子, 渡邊春男, “循環器病の薬物療法: 電位依存性 Ca^{2+} チャネルの分子薬理学と Ca 拮抗薬の差異化”, *メジカルレビュー社*, 2006;:188-199
- [100] G. W. Hennig, C. B. Smith, D. M. O’Shea and T. K. Smith, “Patterns of intracellular and intercellular Ca^{2+} waves in the longitudinal muscle layer of the murine large intestine in vitro”, *Journal of Physiology*, 2002;543:233-253
- [101] A. Welling, “Voltage-Dependent Calcium Channels”, *BIOTREND reviews*, 2009;4:1-11
- [102] 坂田陽子, 青木まゆみ, 清原貞夫, 塚原潤三, “ナマズとヒメジの触鬚における神経線維と味蕾分布”, *日本味と匂学会誌*, 1998;5:511-514
- [103] C. Ayres, G. L. Bowlin, S. C. Henderson, L. Taylor, J. Shultz, J. Alexander, T. A. Telemeco and D. G. Simpson, “Modulation of anisotropy in electrospun tissue-engineering scaffolds: Analysis of fiber alignment by the fast Fourier transform”, *Biomaterials*, 2006;27:5524-5534
- [104] D. Kiriya, M. Ikeda, H. Onoe, M. Takinoue, H. Komatsu, Y. Shimoyama, I. Hamachi and S. Takeuchi, “Meter-long and robust supramolecular strands encapsulated in hydrogel jackets”, *Angewandte Chemie. International Ed. In English*, 2011;51:1553-1557
- [105] S. P. Jones and R. M. A. P. Ridge, “Motor Units in a Skeletal Muscle of Neonatal Rat: Mechanical Properties and Weak Neuromuscular Transmission”, *Journal of Physiology-London*, 1987; 386:355-375
- [106] R. Flindt (訳 浜本哲郎), “数値でみる生物学”, 丸善出版株式会社, 2012
- [107] 超小型送液ポンプ PT03A-2-01, シーアイ化成株式会社

- [108]<http://www.flight-position.com/fp-baiten/baiten-motor.htm>
- [109] 瀧脇正樹, “導電性高分子ソフトアクチュエータを駆動源とするマイクロポンプ”, 日本機械学会誌, 2010; 113: 123
- [110] Y. Itoh, Y. Moriyama, T. Hasegawa, T. A. Endo, T. Toyoda and Y. Gotoh, “Scratch regulates neuronal migration onset via an epithelial-mesenchymal transition-like mechanism”, *Nature Neuroscience*, 2013;16:416-425
- [111] P. M. Jordan, L. D. Ojeda, J. R. Thonhoff, J. Gao, D. Boehning, Y. Yu and P. Yu, “Generation of spinal motor neurons from human fetal brain-derived neural stem cells: role of basic fibroblast growth factor”, *Journal of Neuroscience Research*, 2009;87:318-332
- [112] B. A. Reynolds, W. Tetzlaff and S. Weiss, “A multipotent EGF-responsive striatal embryonic progenitor-cell produces neurons and astrocytes”, *Journal of Neuroscience*, 1992;12:4565-4574
- [113] P. Banerjee, D. Lenz, J. P. Robinson, J. L. Rickus and A. K. Bhunia, “A novel and simple cell-based detection system with a collagen-encapsulated B-lymphocyte cell line as a biosensor for rapid detection of pathogens and toxins”, *Laboratory Investigation*, 2008;88:196-206
- [114] Y.-L. Yang, S. Motte and L. J. Kaufman, “Pore size variable type I collagen gels and their interaction with glioma cells”, *Biomaterials*, 2010;31:5678-5688

Appendix A 細胞の準備と培養

本付録では、各種初代培養の準備方法と各種細胞の培養の手順について述べる。

A.1 初代細胞の準備

本研究では、初代筋芽細胞と初代神経幹細胞をそれぞれラットとマウスから取得した。その詳細な手順を以下に記載する。なお、全てのラットまたはマウスは東京大学動物実験委員会の承認を得て、同委員会実験規則に基づいて取り扱った。

A.1.1 初代筋芽細胞

初代筋芽細胞はラット (1 日齢) (三協ラボサービス) の後肢から取得した。まず、ラットを安楽死させた後、速やかに後肢を付け根部と足首で切断し大腿部を取り出す。大腿部の皮膚と脂肪を取り除き、氷上で冷やした Hanks バッファ中に入れる。Hanks バッファの上清を吸い取り、新しい Hanks バッファを追加することで、大腿部に残った血液を洗い流す。Hanks バッファ中で骨から骨格筋を取り外し、骨格筋をおおよそ 1 mm 片になるように細かく切断する。次に、Hanks バッファの上清を吸い取った後、2 型コラゲナーゼ入り Hanks バッファ (150 U/ml) を入れた状態で 1 時間 37°C CO₂ インキュベータ中にて回転培養し、骨格筋を筋芽細胞に分解した。細胞と溶液のみがセルストレイナーを通過できるため、筋芽細胞を含有した溶液をセルストレイナー (40 μm) を通して、筋芽細胞と不純物を分離した。セルストレイナーで濾過した筋芽細胞含有の溶液にウシ胎児血清 (FBS) を等量追加し、コラゲナーゼの活性を停止させる。最後に、遠心分離によって筋芽細胞と培養液を分離し、初代筋芽細胞を手に入れた。

A.1.2 初代神経幹細胞

初代神経幹細胞はマウス (妊娠 13.5 日目) (三協ラボサービス) の脳から取得した。まず、母親マウスを安楽死させた後、速やかに腹部を切り開き子宮を取り出し、氷上で冷やした PBS バッファと培養液 (ニューロベーサル培地 + L- グルタミン酸 (2 mM) + ペニシリン (100 U/ml), ストレプトマイシン (100 μg/ml)) の混合液中に入れる。子宮から胎児を取り出し、混合液中にて胎児から脳を摘出する。顕微鏡下で中脳を切り出した後、穏やかに数回ピペッティングを行い、神経幹細胞に分離する。

A.2 細胞培養

A.2.1 筋芽細胞培養

筋芽細胞培養では C2C12 と初代筋芽細胞で同じ培養液を用いる。成長用培地と多核化用培地の 2 種類を用意した。成長用培地としては、ダルベッコ改変イーグル培地に 10% FBS と 100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。多核化用培地としては、ダルベッコ改変イーグル培地に 2% ウマ血清 (HS) と 100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。筋芽細胞は栄養分が少なくなると、周囲の細胞を巻きこみ多核化を開始する。つまり、HS は FBS より栄養分が少ないため、多核化用培地中で筋芽細胞は多核化し筋線維になることができる。

C2C12 は成長用培地を用いて 37°C CO₂ インキュベータ中にて培養した。C2C12 は培養皿中の 80% 程度を細胞が占めたら継代を行い、継代回数が 10 回以内の C2C12 を用いた。継代では、トリプシン-EDTA を用いて培養皿から細胞を剥離後に成長用培地と混合することにより、細胞の単離とトリプシンの無効化を行った。最後に、遠心分離によって C2C12 の分離を行った。

A.2.2 神経幹細胞培養

神経幹細胞の培養においても、成長用培地と分化用培地の 2 種類を用意した。成長用培地としては、ニューロベーサル培地にビタミン A 除外 B27 添加剤、ヒト上皮成長因子 (20 ng/ml)、繊維芽細胞増殖因子 (20 ng/ml)、2 mM L- グルタミン酸、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。分化用培地としては、ニューロベーサル培地にビタミン A 除外 B27 添加剤、2 mM L- グルタミン酸、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシンを添加したものをを用いた。

神経幹細胞は成長用培地を用いて 37°C CO₂ インキュベータ中にてシャーレ中にて浮遊培養を行った。約 1 週間後には、神経幹細胞は成長し神経幹細胞スフェロイドを形成した。神経細胞スフェロイドが形成されたら継代を行い、継代回数が 2 回以内の神経幹細胞を用いた。

Appendix B 各種物理モデルの導出方法

本研究で提案した物理モデルまたは理論式の導出方法を、以下にまとめる。

B.1 収縮による変位がある条件での収縮モデル

本部分においては雑誌掲載の形での刊行 (5 年以内に出版予定) が期待されるため、また特許申請が関わるため非公開とする

B.2 骨格筋線維束の収縮力測定方法

PDMS 片持ち梁の撓みから骨格筋線維束の収縮力を求める式 (式 (3.2)) を導出する過程を以下に記載する。Fig. 3. 12(b) に記載のように骨格筋線維束の収縮力が PDMS 片持ち梁に負荷された時、分布荷重 p が PDMS 片持ち梁に負荷されると見なせるため、撓みの公式より撓みと分布荷重 p の関係は、

$$\delta \approx \frac{(3l^4 - 4l(l-t)^3 + (l-t)^4)p}{2Ewh^3} \quad (\text{B.1})$$

と表せる。この時、Fig. 3. 12(b) より、骨格筋線維束の収縮力 F と分布荷重 p の関係は、

$$F = pt \quad (\text{B.2})$$

となるため、式 (B.1) と式 (B.2) をあわせることにより、骨格筋線維束の収縮力 F と撓み関係は、

$$F \approx \frac{2\delta Etw^3}{3l^4 - 4l(l-t)^3 + (l-t)^4} \quad (\text{B.3})$$

となる。骨格筋線維束の収縮が等尺収縮であった場合、式 (非公開) のように骨格筋線維束の最大能動的張力が骨格筋線維束の収縮力になるため、式 (3.2) が導き出される。

Appendix C 各種評価方法

本研究で使用した各種評価方法の詳細を、以下にまとめる。

C.1 免疫染色

本節では、骨格筋線維における α -アクチニンの免疫染色方法または細胞核とミオゲニンの免疫染色方法と、神経-筋肉組織における神経細胞と骨格筋線維のアセチルコリン受容体の免疫染色方法を記載する。

まず骨格筋線維における α -アクチニンの免疫染色法を記述する。まず、作製した骨格筋線維束を PBS により洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドに一晩浸けて固定した。PBS を用いて再度洗浄した後、0.1% の Triton X-100 を含む PBS 溶液に骨格筋線維束を 20 分間浸けた。その後 PBS で洗浄し、5% のウシ血清アルブミン (BSA) を添加した PBS 溶液に一晩浸けた。再度 PBS で洗った後、 α -アクチニン抗体 (monoclonal anti- α -actinin (sarcomeric) antibody produced in mouse) を 0.1% の容量分加えた状態で 24 時間静置した。最後に PBS による洗浄後、Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody を 0.1% の容量分添加し、室温で 1 時間培養して蛍光物質を抗体に結合させる。最後に PBS で洗浄したものを観察用のサンプルとして使用する。

次に骨格筋線維における細胞核とミオゲニンの 2 重免疫染色法を記述する。まず、作製した骨格筋線維束を PBS を用いて洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドに一晩浸けて固定した。その後、再度 PBS を用いて洗浄した後、0.1% の Triton X-100 を含む PBS 溶液に骨格筋線維束を 15 分間浸ける。再び PBS を用いて洗浄し、2% BSA を含む PBS 溶液に骨格筋線維束を一晩浸ける。次に、抗ミオゲニン抗体 (anti-myogenin Alexa Fluor 488) を 1% の容量分添加し、この状態で一晩置き骨格筋線維のミオゲニンに蛍光物質を付ける。最後に PBS で洗浄した後、0.1% の容量分の Hoechst33342 を添加し、細胞核を染色させる。過度な染色を防ぐために、PBS で最後洗浄したものを観察用のサンプルとして使用する。

最後に、神経細胞と骨格筋線維のアセチルコリン受容体の 2 重免疫染色法を記述する。まず、作製した神経-筋肉組織を 2 $\mu\text{g/ml}$ の蛍光標識付きの α -ブンガロトキシン (Alexa Fluor 488 conjugated α -Bungarotoxin) 内で 1 時間培養する。ブンガロトキシンはアセチルコリン受容体のアンタゴニストであるため、受容体上に固定される。その後、神経-筋肉組織を PBS により洗浄し、4% パラホルムアルデヒドに一晩浸けて固定した。再度 PBS を用いて洗浄した後、

0.1% の Triton X-100 を含む PBS 溶液に骨格筋線維束を 15 分間浸ける。再び PBS を用いて洗浄し、2% のウシ血清アルブミン (BSA) を含む PBS 溶液に骨格筋線維束を一晩浸ける。次に、抗 β -チューブリン抗体 (mouse monoclonal anti- β -Tubulin III (neuronal)) を 0.1% の容量分添加し、この状態で一晩置き神経細胞に抗体を付ける。次に PBS 溶液により洗浄した後に、Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody を 0.2% の容量分添加し、室温で 2 時間培養して蛍光物質を抗体に結合させる。最後に PBS で洗浄したものを観察用のサンプルとして使用する。

C.2 凍結切片

本節では、骨格筋線維束の凍結切片構築法を記載する。

まず、作製した骨格筋線維束を PBS を用いて洗浄した後、4% パラホルムアルデヒドに一晩浸けて固定した。再び PBS で洗浄した後に、10%、20%、30% のスクロース溶液に一晩ずつ浸けていき、骨格筋線維束が高濃度のスクロース溶液中に沈むようにする。この状態で骨格筋線維束をスクロース溶液から取り出し、プラスチックケースにおいて OCT コンパウンド中に沈ませる。この状態で 2 日間室温で放置し骨格筋線維束中に OCT コンパウンドを浸透させる。次に、プラスチックケースを液体窒素に入れることにより、OCT コンパウンドごと骨格筋線維束を凍結させる。OCT コンパウンドに包埋された骨格筋線維束をクリオスタットに設置し、厚さ 8 μm の凍結切片を構築する。構築した凍結切片はスライドガラス上に貼り付けることにより、OCT コンパウンドが溶けてガラス上に接着する。

C.3 HE 染色

本節では、スライドガラス上に接着した凍結切片を HE 染色する方法について記載する。

まず、スライドガラス上の凍結切片周辺に存在する OCT コンパウンドを水で洗浄する。スライドガラスに付着した水滴をきれいに拭き取った後に、ヘマトキシリン溶液下で 1 分反応させる。その後、スライドガラスを流水で洗浄し、洗瓶中にて 5 分間流水にて洗浄させる。再度スライドガラスに付着した水滴をきれいに拭き取り、エオシン溶液下で 1 分反応させる。スライドガラスを流水で再び洗浄し、70%、80%、90%、100% エタノール溶液に目安として 3 分間ずつ反応させて、ヘマトキシリンとエオシンの染色が抜けすぎない状態で脱水化させる。最後にカバーガラスを組織上にかぶせて、カバーガラスの縁をマニキュアで封止することで、組織切片の乾燥を防止させる。この HE 染色によって、細胞質が薄いピンク色に、細

胞核が藍色に染まる。

C.4 RT-PCR

RT-PCR の実施は、神経 - 筋肉組織から mRNA の分離、mRNA からの cDNA 合成、cDNA とプライマーを用いた PCR の 3 段階を経て行われる。

神経 - 筋肉組織からの mRNA 分離には Pure Link RNA Mini Kit (Ambion) を用いた。1 ml の Lysis buffer に 10 μ l の 2-メルカプトエタノールを添加した溶液をエッペンチューブに入れ、その中に PBS で洗浄した後の神経 - 筋肉組織を入れる。21G の注射針を付けたシリンジにてピペティングを繰り返し、組織を均等に溶解させる。このエッペンチューブに 70% エタノールを添加した後、ボルテックスをかけて十分混合させる。その後、キットに付属のカラムに溶液を移し、遠心機により 12,000G で 15 秒間負荷をかけ mRNA をカラムに付着させる。Washing buffer をカラムに移し同様に 12,000G の負荷をかけた後に、カラムに溶液がない状態で 12,000G の負荷を 2 分間かけ、溶液をカラムから取り除く。RNA フリーの水を 100 μ l カラムに注入し、2 分間静置してカラムに付着した mRNA を溶解させた後に、12,000G の負荷を 2 分間かけ、カラムから出た溶液を回収する。最後に、Nano drop を用いて回収された水に溶解された mRNA 量を計測した。

cDNA 合成には SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) を用いた。まず、定量的に cDNA を合成するため、1 μ g の mRNA を含む水溶液を用意する。この水溶液に Oligo(dT) と dNTP mix を 1 μ l ずつ加えた後に、RNA フリーの水を追加する。この混合溶液を 65°C で 5 分間温めた後、氷上に 1 分間静置して冷却する。キットのプロトコール通りに酵素等を加えた後、50°C で 1 時間温め cDNA を合成する。次に、75°C に 15 分間置き反応を停止させた後に、氷上に 5 分間置き冷却させる。最後に、2 単位のリボヌクラーゼ (RNase H) を加え 37°C で 20 分間温めることにより、RNA を分解させる。

PCR においては TaKaRa Ex Taq (タカラバイオ株式会社) を用いた。プロトコール通りに酵素等と cDNA、プライマーを混合した後に、PCR 装置によって PCR をかける。一方、トリス酢酸 EDTA バッファ (TAE) に 1% アガロースを溶かし、硬化する直前に 15 nl/ml になるようにエチジウムブロマイドを添加する。これを PCR 用の型に入れてゲル化させる。PCR 装置にアガロースゲルを設置させ、染色液と混合させた PCR 溶液をアガロースゲルに添加した後、電圧の印加により電気泳動を行う。最後に紫外光下で蛍光観察を行う。

Appendix C

なお, *GAPDH* のプライマーは次の通りである. *GAPDH* forward, 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'; *GAPDH* reverse, 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'. また, *Hlxb9* のプライマーは次の通りである. *Hlxb9* forward, 5'-TTTGGTTCCAGAACCGCCGAATG-3'; *Hlxb9* reverse, 5'-TGGTTGTCTCCAAAGGAGGGTTCA-3'

Appendix D 装置・薬品・物性値

本研究で使用した装置・薬品などを、以下にまとめる。

D.1 使用した装置・薬品

使用した装置・薬品をそれぞれ Table D. 1 と Table D. 2 にまとめる。

Table D. 1 使用した装置

装置	メーカー	型番
バイオ関連		
ファンクションジェネレータ	Agilent	33220A
オシロスコープ	Tektronix	TDS2024C
アンプ	Mess-Tek LTD.	M-2629B
蛍光顕微鏡	オリンパス	IX71N
共焦点顕微鏡	Zeiss	LSM780
生物顕微鏡	オリンパス	BX51WI
蛍光実体顕微鏡	オリンパス	MVX10
一眼レフカメラ	Canon	EOS Kiss X6i
UV 光装置	Vilber Lourmat	E-BOX-VX2/20M
サーマルサイクラー	Applied Biosystems	9902
デバイス作製関連		
光造形装置	enVision TEC	Perfactory11
パリレン蒸着装置	日本パリレン	PDS2010
蒸着装置	サンヨー電子	SVC-700TM
マスクアライナー	ユニオン光学	PEM-6M
プラズマ発生装置	サムコ	FA-1

Table D.2 使用した薬品

薬品	メーカー
マトリゲル (グロースファクターリデュースト)	Becton, Dickinson and Company
フィブロネクチン (Fibronectin, Bovine, Stabilized)	Biomedical Technologies, Inc.
アガロース	Invitrogen
Dil 粉末	Molecular Probes
4% パラホルムアルデヒド	武蔵野化学
α - アクチニン抗体	Sigma-Aldrich
Hoechst33342	ナカライテスク
ミオゲニン抗体	eBioscience
抗 β チューブリン (神経)	Invitrogen
α - ブンガロトキシシン	Molecular Probes
ウシ血清アルブミン	Sigma-Aldrich
Triton X-100	Alfa Aesar
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody	Invitrogen
Alexa Fluor 568 goat anti-mouse IgG (H+L) antibody	Invitrogen
スクロース	ナカライテスク
OCT コンパウンド	Triangle Biomedical Science
ヘマトキリン	和光純薬工業
エオシン	武藤化学
光硬化性接着剤	Henkel Technologies
ニカルジピン塩酸塩	Sigma-Aldrich
グルタミン酸	Sigma-Aldrich
クラレー	東京化成工業
コラーゲン	高研
コラーゲナーゼ	Sigma-Aldrich

Table D. 2 使用した薬品

アルギン酸ナトリウム	和光純薬工業
アルギナーゼ	Sigma-Aldrich
LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit, for mammalian cells	Invitrogen
ダルベッコ改変イーグル培地 (4.5 g glucose/L)	Sigma-Aldrich
リン酸緩衝生理食塩水	Sigma-Aldrich
ウシ胎児血清	Japam Bio serum
ウマ血清	Invitrogen
ニューロベーサル培地	Invitrogen
L-グルタミン酸	和光純薬工業
ビタミン A 除外 B27 添加剤	Invitrogen
ヒト上皮成長因子	Peprtech
繊維芽細胞増殖因子	Peprtech

D.2 使用した素材の物性値

本研究で使用した素材の物性値を以下にまとめる。

Table D. 3 シミュレーション物性値

部位	値
パリレンヤング率	2.758 GPa
剛体の高さ	2 mm

Table D. 4 細幅骨格筋線維束収縮力計測用 PDMS デバイス物性値

部位	値
PDMS ヤング率	1.5 MPa
ガラス板と片持ち梁の接触部長さ	0.25 mm

Table D. 4 細幅骨格筋線維束収縮力計測用 PDMS デバイス物性値

片持ち梁の奥行	8 mm
片持ち梁の高さ	0.4 mm
片持ち梁の長さ	3 mm

Table D. 5 シート積層による骨格筋線維束収縮力計測用 PDMS 片持ち梁物性値

部位	値
PDMS ヤング率	1.5 MPa
片持ち梁の断面二次モーメント	4.5×10^{-12} mm
固定部材の長さ	4.5 mm
片持ち梁の長さ	3 mm または 10 mm

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官である竹内昌治准教授には大変お世話になりました。企業を辞めた私を暖かく迎えてくださり、改めて研究の方向性から研究発表の仕方まで幅広く指導していただきました。常に自由に実験をやらせていただき、やりたい研究を好きなだけできる環境を提供していただきました。博士課程の間、体力的にも精神的にも辛い日々が続きましたが、企業を辞め竹内研に戻ってきたおかげで楽しい時間を過ごせて良かったです。修士課程から博士課程まで5年間お世話になり、少しは成長できたのではないかなと思っています。ただもう少し絵がうまくなり、描く度に怒られることが無くなればとも思っています。

博士論文審査にて副査をお願い致しました、東京大学生産技術研究所の藤田博之教授、同大学情報理工学系研究科知能機械情報学専攻の下山勲教授、同大学先端科学技術研究センターの神崎亮平教授、同大学情報理工学系研究科知能機械情報学専攻の正宗賢准教授にはお時間を割いていただき、本論文をまとめるに当たり有益なご助言をいただきました。誠にありがとうございました。

また、富士フイルム株式会社の山川真一博士にはシミュレーションに関する助言を受けました。会社を辞めてからほとんど連絡を取っておらず突然の質問をお願いする形だったのですが、非常に丁寧に相談にのっていただき大変感謝しております。

尾上弘晃助教にも大変お世話になりました。筋肉の駆動に関するメカニズムから理論式、デバイスの設計まで様々なことに関して議論していただき、尾上助教の意見を支えることで研究を進めることができました。いつも突然話しかけても対応してくださるので、何度も甘えて頼りにしてしまいご迷惑をおかけいたしました。尾上助教のような教え方ができるように、今後精進していきたいと思っております。根岸みどり博士には、神経に関する知識から実験手順まで幅広く教えていただきました。本論文に神経を扱った成果が載っているのは、根岸博士のご協力のおかげだと思っております。席が近かったこともあり、良く雑談をさせていただき様々な相談にのっていただきました。栗林(繁富)香織博士には、筋肉を用いた研究に関して議論していただき、北海道大学に移られた後も定期的に議論を重ねていただきました。そのネタ面白いと言って背中を押されることで、安心して研究に臨むことができました。興津輝特任教授には、ミーティングの時に的確なアドバイスや指摘をくださり、研究の方向性を深く考えることができました。佐藤幸治特任講師には、生物分野の研究者として視点から様々な意見をくださり、自分の研究の足りない部分を補うことができました。許允禎特任助教には、研究だけでなくいろいろな話をしていただきました。特に、お酒を飲んだ時の許特任助教の話は、研究生活の心のやすらぎでした。大崎寿久特任助教には、研究に向か

う姿勢を教えていただきました。大崎特任助教の研究へのストイックな態度は、今後も真似ていきたいと思えます。岩永進太郎博士には、初代筋芽細胞の分離の仕方から培養のコツまで筋肉について様々なことを教えていただきました。岩永博士が身近にいらしたので、筋芽細胞培養について様々な助言を早急にいただき、研究の進捗を早めることができました。三浦重徳博士には RT-PCR のやり方など様々な実験テクニックを教えていただきました。また、私の無駄な絡みにも温かく対応してくださり、楽しい時間を過ごすことができました。Amy Hsiao 博士には、論文から学会発表まで多数の場面で英語の添削をしていただきました。優しい言葉で励ましながら指導していただき大変助かりました。Won Chul Lee 博士にも、学会発表での英語から研究内容についての的確な助言をいただきました。友池史明博士には、ちょうど疲れている場面を見計らったように温かい言葉をかけていただき、疲弊している時に安らぎを感じることができました。佐藤暁子研究員は、私が書く絵の配色について忌憚のない意見をくださり、そのご指導のおかげで人目に耐えうる絵を描くことができました。

また、技術補佐員の方々にも大変お世話になりました。小貫真委子さんには、備品の管理や機器のメンテナンスなど様々な点でご助力いただきました。特に、8 階実験室の様々な世話をしていただき、日々実験がスムーズに行えたのもひとえに小貫さんのおかげだと思っております。伊藤茜さんには、細胞培養や免疫染色など様々な生物実験の方法についてご助言をいただき、多くの実験を迷いなく行うことができました。青柳星見さんには、発表用の絵を描くのにご助力いただき、青柳さんの絵の技術が欲しいと心から思うほど素晴らしい絵を書いていただきました。

また、学生の方々にも大変お世話になりました。手島哲彦さんと外岡大志さんは同期として朝から晩まで一緒に実験し、たまには飲み会に行ってストレスを発散したり、様々な時間を過ごさせていただきました。卒業生からいきなり同期になったのに、快く受け入れてくれてありがとうございます。吉田昭太郎さんや Daniela Serien さんとは席が近いこともあって、様々なことを議論してもらいました。特に、吉田さんからはデバイス作製プロセスについて議論させていただき、大変助かりました。

その他にも、多くの先輩・後輩達、友人など、たくさんの方々に博士課程 3 年間の間支えられて研究を進めることができました。深く感謝しております。特に、家族には就職して家を出たはずの子供が実家に帰ることを許していただき、自由な生活をさせていただいたことに感謝の意を表し、謝辞の括りとさせていただきます。