

トピックス

ステントグラフト内挿術での応用を目指した生体組織  
 —高分子材料接着装置の開発

Development of biological tissue-polymer binding device for stent-grafting

木村 剛, 柴 久美子, 加藤 綾子,  
 樋上 哲哉, 増澤 徹, 岸田 晶夫

Tsuyoshi KIMURA, Kumiko SHIBA, Ayako KATO,  
 Tetsuya HIGAMI, Touru MASUZAWA, Akio KISHIDA

Abstract

Stent-graft is a tubular metal web (stent) covered by a woven polyester tube (graft), and is placed inside of a diseased (aneurysmal) vessel. Recently, this endovascular stent-grafting is one of important techniques to treat abdominal aortic aneurysms. However, an endoleakage, which is blood flow into the aneurysm, is a major complication after the endovascular treatment abdominal aortic aneurysm. Therefore, in the present work, we developed a novel pressure-vibration device, which is optimized for bonding tissue and polymer, for effective steady stent-grafting. This device consists of the hand-piece including the nano vibration generator and the nano vibration controller, called as Mono-vibration adhesion device. Also, Harmonic Scalpel was used as an ultrasonically activated scalpel. As a living tissue sample, porcine aorta, peritoneum, and pericardial sac were used. As a polymer film, cellophane, vinylon, polyurethane, dacron, polyester, the silicone rubber, polyvinyl chloride, and polyethylene were used. Tissue-polymer adhesion test was performed as the following procedure. The living tissue and the polymer film were piled up, and it placed with the blade. The tissue-polymer adhesion was examined under various vibration conditions (output, holding-time, and frequency). Also, the tissue damage of the joining surface was observed by hematoxylin-eosin staining. Several kinds of polymer film were able to be bonded to the biological tissue using both Harmonic Scalpel and Nano vibration adhesion device. Cellophane, vinylon, polyester, and polyurethane were able to be bonded to aorta, peritoneum, and some part of them were bonded to pericardial sac. On the other hand, bonding was not admitted regardless of the output or the frequency on dacron, silicone rubber, polyvinyl chloride, and polyethylene. Histological evaluation was performed for each polymer-tissue adhesion. Because of heating during adhesion test, nuclear deformation and vacuolation were observed in the bonding surface. These findings were more evident in adhesion of Harmonic Scalpel, probably because of its high generating power. Compared with this, in the adhesion of Nano vibration adhesion device, continuity of the vessel wall structure was relatively preserved. Therefore, in the tissue invading aspect, Nano vibration adhesion device has efficacy as safer polymer-tissue adhesion method.

**Key Words** : stent-graft, tissue-polymer adhesion, ultrasonic, nano-vibration

1. はじめに

我が国における三大死因である悪性新生物, 心疾患, 脳血管疾患の占める割合は, それぞれ30.1%, 16.0%,

12.3% (平成17年 人口動態統計) であるが, 循環器系疾患全体の患者数は悪性新生物の4倍であり, 国内では約100万人が罹患し, 年に7万人以上が亡くなっている。今後, 生活習慣, 高齢化等を考慮すると, 循環器系疾患の患者数は増加すると考えられる。循環器系疾患に対する医療技術の一つとして, ステントおよびステントグラフト (図1) が注目されている。ステント法とは, 動脈にカテーテルを挿入し, 金属製のステントあるいはステ

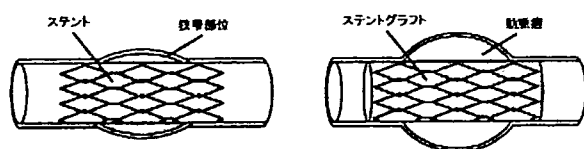


図1 ステント法 (ステントとステントグラフト)

ントに人工血管 (ダクロン) を被せたステントグラフトを狭窄部位あるいは動脈瘤の部位に送達、留置させる。それぞれ、狭窄部位での血流の確保、大動脈瘤内への圧力抑制による動脈瘤の破裂防止が可能となる。ステント法は、従来の手術方法と比べて低侵襲であるため、高齢者や合併症を持つ人に対して、より安全に行うことができ、出血量の軽減、手術時間、入院期間の短縮をはかることが可能である。しかしながら、ステント法は縫合を行っていないためステント (ステントグラフト) と動脈との接着が不完全であり、ステント位置のズレあるいは動脈瘤内への血液の漏れ (エンドリーク) が再発してしまう恐れがある。術後エンドリーク率は腹部大動脈瘤では5%、胸部大動脈瘤では25%とされている。このような状況において、大動脈へ良好に密着し、動脈瘤内への血液漏れの再発防止をすることができれば、動脈瘤手術において大きく貢献できると考えられる。

最近、冠動脈バイパス手術において、グラフト血管である内胸動脈 (Internal thoracic artery:ITA) を簡便かつ安全に採取する法として、超音波メスを用いたultrasonic complete skeletonization (UCS)法がある<sup>1)</sup>。超音波メスは、超音波振動によって生じる摩擦熱を使って組織を凝固切開する方法であり、メス、電気メスなどと異なり切断面を緩じながら切断することができる。機序として、発生する摩擦熱 (約80℃) によりタンパク質が融解・凝固すると考えられており、従来の熱を利用した切離器具などに比べ早期の創傷治癒が期待できる。我々はこの点にヒントを得て、生体組織間あるいは生体組織と人工材料の接着を低エネルギーにて行う接着技術の開発を行った。具体的には、ナノ振動、熱および圧着強度のバランスによって、組織中の結合性タンパク質が構造変性し、これによって生体組織どうしあるいは生体組織と人工材料の接着を可能にする技術である。本研究では、ステントグラフト内挿術への応用を目指し、低エネルギー接着技術を用いた、生体組織と人工材料との接着について検討した。

## 2. 実験方法

ナノ振動接着装置の構成を図2(A)に示す。本装置は、ナノ振動発生器を含むハンドピース (図2(B))、ナノ振動制御装置 (図2(C))、レーザー発生装置 (図2(D)) から構成される。ナノ振動周波数は0~30kHz、レーザー出力範囲は0~3.0Wのスペックを有する。市販の超音波メス装置としては、Harmonic Scalpel II (ETHICON ENDO-SURGERY a Johnson & Johnson company.) を用いた。振動周波数55.5kHz、電力出力LV1~5、振幅が50

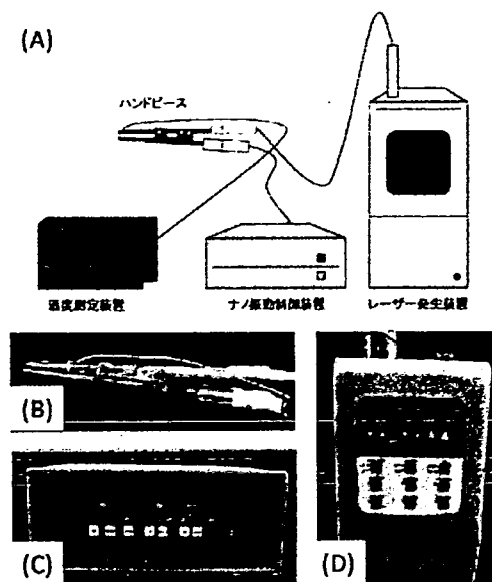


図2 ナノ振動接着装置(A)装置構成、(B)ハンドピース、(C)ナノ振動制御装置、(D)レーザー発生装置

~100 $\mu$ mの仕様である。ハンドピースとしては、ハンドグリップのLaparoSonic Coagulating Shears (LCS) 型を使用した。生体試料としては、食用ブタの大動脈、心膜、腹膜を用いた。それぞれの組織をトリミングし、約15×15mmの組織片に調製した。高分子材料としては、セロファン、ビニロン、ポリウレタン、ダクロン、ポリエステル、シリコーンゴム、ポリ塩化ビニル、ポリエチレンなどの高分子フィルムを用いた。それぞれのフィルムの厚さは0.1~0.5mmであった。生体試料と高分子フィルムを各装置のブレードで挟み、様々な振動条件 (出力、周波数、把持時間) にて接着を行った。ここでは、超音波メスではブレードの振動面を材料側に、ナノ振動接着装置ではレーザー発生装置が接続する面をフィルム側とした。

## 3. 結果と考察

ナノ振動接着装置および超音波メスを用いて生体組織と接着可能な高分子材料の探索を行った (表1)。セロファン、ビニロン、ポリエステル、ポリウレタンでは両装置において生体組織との接着が認められた。一部、出力の低いナノ振動接着装置では、超音波メスで接着したフィルムであっても接着されない場合があった。一方、ポリ塩化ビニル、ダクロン、シリコーンゴムでは接着が認められなかった。ポリエチレンの場合は、接着されず融解された。接着の認められたフィルムについて、接着後のマクロ観察を行った。ナノ振動接着装置では超音波メスよりも少ない組織損傷で接着させることができた (図3)。

ナノ振動接着装置で接着した高分子フィルムを用いて接着温度の検討を行った。大動脈、腹膜と高分子材料の接着温度をそれぞれ接着装置先端に搭載した温度センサーにより検出した。接着温度はフィルムにより異なり、

表1 ポリマーフィルムと生体組織の接着

表1. ポリマーフィルムと生体組織の接着

Polymer film	Harmonic Scalpel II			Nano Vibration Device		
	vessel	ab.m*	c.m.**	vessel	ab.m*	c.m.**
Cellulophane	+	+	+	+	+	-
Vinylon	+	+	+	+	+	+
Polyester	+	+	+	+	+	+
Polyurethane	-	+	+	+	+	-
Polyvinyl chloride	-	-	-	-	-	-
Polyethylene	-	-	-	-	-	-
Polyethylene terephthalate	-	-	-	-	-	-
Silicone rubber	-	-	-	-	-	-

- : failed adhesion + : successful adhesion  
\*ab.m: abdominal membrane \*\*c.m: cardiac membrane

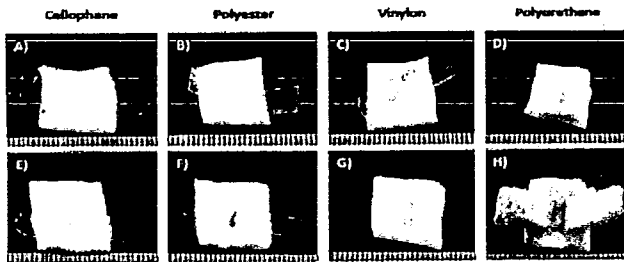


図3 ポリマーフィルムと生体組織（血管）の接着（A-D：ナノ振動接着装置、E-H：ハーモニックスカルペル）

大動脈、腹膜での接着では、ビニロン<セロファン<ポリエステル<ポリウレタンの順に高くなった。接着温度は各高分子材料の融点に影響すると推察される。そこで、超音波メスで行った生体組織-高分子材料の接着実験における出力および把持時間の影響を検討した。出力レベルの増加および把持時間の増加に伴う接着の向上が期待できる。超音波メスでは出力レベルが高くなるほど、把持時間が長くなるほど接着が容易となった。出力が高くなるほどブレードの到達温度が上昇し、上記で検討した接着温度に至ったためと考えられる。また、大動脈よりも膜厚の薄い腹膜において、低い出力、短い把持時間での接着が認められた。膜厚が薄いほど、熱エネルギーの到達速度が速く、速やかに組織温度が上昇し、早期に接着温度に到達したためと考えられる。セロファン以外の高分子材料でも同様のことが言える。

さらに、出力、把持時間、周波数の影響についてナノ振動接着装置にて詳細に検討した。ナノ振動接着装置では振動周波数が0~30kHzに調節できるため、振動の影響を詳細に検討できる。大動脈、腹膜と高分子材料の接着結果を表2に示す。セロファンにおいては良好な接着が認められ、一部では、周波数が0の加熱のみの場合でも接着が示された。ポリエステルの場合、接着温度が高いため、ナノ振動接着装置の最大出力である3.0Wの場合のみ接着が認められた。このとき、大動脈、腹膜ともに周波数が高いほど接着が容易となった。加熱だけでなく振動が接着に影響したことを示す。同様に、ポリウレタンも接着温度が高いため、ナノ振動接着装置の最大出力である3.0Wの場合のみ接着が認められた。ここでも周波数が高い場合に接着が容易であり、生体組織と高分子材料の接着に振動が強く影響を及ぼすことが示めされた。

以上の結果から、超音波メスおよびナノ振動接着装置

表2 生体組織-高分子フィルムの接着における振動の影響

表2. 生体組織-高分子フィルムの接着における振動の影響

Polymer	Power (W)	Frequency (kHz)	Time (second)			
			20	30	40	60
Cellulophane	2.0	3	-	-	-	-
	3.0	0	-	+	+	++
	3.0	3	-	+	+	+
	3.0	12	-	+	+	+
Polyester	2.6	12	-	-	-	-
	3.0	0	-	-	-	-
	3.0	1	-	-	-	+
	3.0	6	-	-	-	+
Polyurethane	3.0	12	-	-	-	++
	2.0	12	-	-	-	-
	3.0	0	-	-	-	-
	3.0	3	-	-	-	++
	3.0	6	-	-	-	++
	3.0	12	-	-	-	++

- : failed adhesion + : successful adhesion ++ : successful adhesion (tissue burned)

による生体組織-高分子材料の接着実験により、接着が起りやすい以下の条件が明らかとなった。

- 1) ナノ振動接着装置および超音波メスにて、生体組織-高分子材料の接着を行うことが可能であり、ナノ振動接着装置にて低侵襲での接着が可能である。
- 2) 生体組織-高分子材料の接着には、高分子材料の性質が影響する。
- 3) 生体組織の膜厚は薄い方が接着しやすい。
- 4) 熱のみでも接着は可能であるが、振動を与えることで接着が容易になる。

1) の装置の違いについては、超音波メスでは高レベル、短時間の超音波振動により、産生される熱エネルギーが拡散しにくく、効率的な高分子溶解がなされていると考えられる。一方、ナノ振動接着装置では、低出力、長時間の振動では、産生される熱エネルギーが拡散し、高分子の溶解効率が低くなるが、組織侵襲は少なく接着させることができたと考えられる。

2) については、超音波振動にて産生される熱エネルギーにより高分子が融解し高分子同士の絡み合いが起り、その後、温度の低下により固化し、接着されたと考えられる。このことから、接着温度としては高分子材料の融点以上である必要があり、用いる高分子材料により接着条件が異なると考えられる。

3) については、生体組織およびフィルムの膜厚が接着に影響することが、生体組織の種類を変えることで検討できた。生体組織と接着可能な高分子材料についてはその材料の種類に関わらず、大動脈よりも膜厚の薄い腹膜において接着が容易だった。これについては、熱の伝達効率が関係していると考えられる。

4) については、ナノ振動接着装置では、ナノ振動により細胞蛋白の水素結合が破壊され、コアグュラムと呼ばれる粘性変性蛋白を生じること、レーザー発生装置により刃先が熱せられることにより蛋白質の熱変性を生じさせ、これによって蛋白の熱変性癒合が生じると考える。熱のみでも細胞蛋白の水素結合の破壊は起こるだろうが、ナノ振動を加えることでより効率的に水素結合の破壊が起り、生体組織-高分子材料間の接着が容易になると推察される。

#### 4. 謝辞

本研究の一部は、厚生労働省科学研究補助金および戦略的創造研究推進事業（CREST）の補助を受けて行われた。

#### 5. 参考論文

- 1) 樋上哲哉, 超音波メスによる新しい内胸動脈採取法, 金芳堂, 2004

2C11

## 微小振動による細胞の接着制御の検討

(東医歯大・生材研) ○岸田晶夫, 木村 剛  
 (茨城大・工) 草間 淳, 石丸正臣, 増澤 徹  
 (国立循環器病セ・研究所) 藤里俊哉

## 1) 目的

人工材料と細胞との相互作用については、種々の観点からの検討が行われている。我々は材料表面の分子運動の影響を考える基礎研究として、微小振動表面上での細胞の機能変化を検討している。これにより、分子運動性の生物刺激機能の評価を行うとともに、物理刺激による細胞の機能制御法の開発を目指している。現在、特に注目しているのは、再生医療などへの応用が期待されている幹細胞類である。本研究では自作の水平方向振動負荷装置を用いて、微小振動の機能細胞への影響について検討を行った。

## 2) 実験

細胞としてマウス胎児線維芽細胞 (MEF)、ブタ骨髄幹細胞 (PMBC) を用いた。接着性および増殖性への影響の検討として、細胞播種後に一定時間の振動を付加し、その後の接着数あるいは細胞数の増加分を測定して比較した。微小振動付加時間は、60 分間とした。振動周波数は 0Hz (control), 10Hz, 100Hz, 1kHz, 10kHz の 5 種類に設定した。細胞を播種する基材としてプラズマ処理した treated 基材と、プラズマ処理していない non-treated 基材を用いた。一定期間経過後に細胞数をカウントし、接着・増殖性の評価とした。

## 3) 結果

図 1 および 2 は、それぞれ MEF 細胞を Non-treated 基材上で 1 時間培養した位相差顕微鏡写真である。1 は静置培養 (0Hz) および 2 は 10kHz で水平振動を行っている。図より明らかなように、2 の振動刺激を付加した方が、細胞の進展が良好である。元来、Non-Treated 基材上では細胞は接着し難いことが知られており、1 の 0Hz での結果は従来と同じ結果が得られている。2 では、水平振動を付加するだけで、細胞の偽足の進展や接着面積の増大が観察され、微小振動が接着機能に影響を与えていることが明確にわかる。

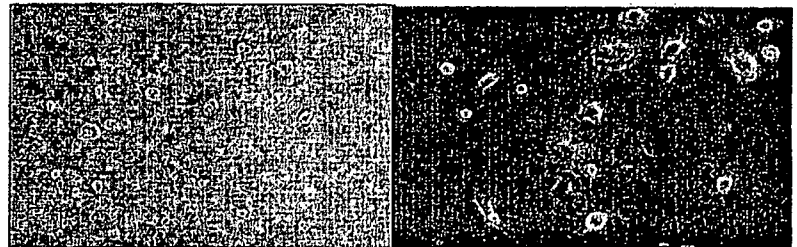


図 1 静置培養

図 2 振動培養

## 4) まとめ

細胞膜は固定されたものでなく、常時流動しており、またそこにはめ込まれている膜タンパク質も同様に流動している。これらの分子を特異的に刺激することにより、細胞のシグナル経路を活性化し、細胞機能を制御できる可能性がある。本研究で試みた振動刺激では 10kHz という比較的 low 周波 (分子の運動と比較して) 領域に於いて接着現象に影響を与えることが示された。今後、より広範囲の振動、波形、付加時間および細胞種について検討することにより、有用細胞の機械的刺激による機能制御法が開発されると期待される。

Study of the effect of nano-vibration on cell functions., Akio Kishida, Tsuyosi Kimura (Tokyo Medical and Dental University), Jun Kusama, Masaomi Ishimaru, Tohru Masuzawa (Ibaragi University), Toshiya Fujisato (Natl Cardiovasc Center Res Inst), 2-3-10 Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo 101-0062, Japan. TEL:03-5280-8028, FAX:03-5280-8005, email: kishida.fm@tmd.ac.jp

**NANO-VIBRATING CELL CULTURE SYSTEM FOR TISSUE ENGINEERING**

Akio Kishida, Tsuyoshi Kimura, Tsutomu Furuzono, Toshiya Fujisato, Tooru Masuzawa

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University  
2-3-10 Kanda-Surugadai Chiyoda-ku 101-0062 JAPAN

One of key factors affecting the effective application of tissue engineering is the handlings of cells. Especially, providing the large amount of cell is one of the major concern. Physical stress and stimuli, such as 2-D stretch, static pressure and shear stress, have been extensively studied for controlling cell function for example, adhesion, proliferation and secretion of useful proteins. In this study, we report the effect of physical stimulation on the cell function, cell adhesion and proliferation. Here, we adopted nano-vibration stimulation system as a novel physical stimulation method. The equipment was assembled using piezo-electric actuator and set to apply micrometer- to nanometer- amplitude. To investigate the effect of nano-vibration, HUVECs, L929 and mouse embryonic fibroblast (MEF) cells were used as model cells. Adhesion and proliferation of those cells were investigated. In case of initial-adhesion, the cell adhesion was emphasized by nano-vibration to become 1.3 times higher adhered cell number in 1 hour incubation. The effective frequency was different according to the cell. In case of nano-vibrating the adhered cells, the proliferation of HUVECs was promoted at different frequency, respectively. The most drastic effect of nano-vibration was observed in the case of MEF adhesion and proliferation. As basic study to use this system to stem cell culture, porcine bone marrow cell (PMBC) was cultured on this equipment. The same kind of effect on PMBC was observed. These findings may lead to a novel cell culture systems to proliferate and control stem cells.

---

第23回医用高分子研究会講座●講演要旨集

---

# ブレイクスルーを誘発する医用 高分子研究における基礎

---

2005年11月21日(月) ～ 22日(火)

---

東京・東京大学山上会館大会議室

---



社団法人 高分子学会 THE SOCIETY OF POLYMER SCIENCE, JAPAN

---

## 医療デバイス開発における医用高分子

(東京医科歯科大学生体材料工学研究所) 岸田 晶夫  
TEL&FAX 03-5280-8028 e-mail kishida.fm@tmd.ac.jp

### 1. はじめに

ポリメチルメタクリレートがコンタクトレンズとして、また再生セルロースが人工腎臓として用いられて以来、人工血管、人工肺、人工心臓など、高分子材料は医療デバイスの中心的存在であり、材料開発の進展が医療デバイス自体の改良・発展を支えていた。

1990年前後より、材料開発のスピードが鈍化し、新しい人工臓器の構造に関する新規アイデア提案数の鈍化などから、人工臓器自体の開発スピードも鈍化した。さらに、これと平行するように、再生医療・組織工学の概念が提案され、人工素材としては生体分解吸収性材料のみが脚光を浴びる状況となった。再生医療の基盤技術としての生分解性材料の研究は、材料自体の開発そのものの研究よりはむしろ、マイクロ加工、ナノファイバー化、パターン表面など、製造プロセスを対象とするものが多く、新規生分解性高分子に関する提案は数すくない。このように、現在もしくはこれからの医療および医療デバイス開発における医用高分子の重要度については、医療現場からの実際のニーズの把握と、新しい工学要素の導入がなされない限り、低下する可能性がある。このような観点から、本発表では、これまでの医療デバイス開発の経緯を振り返り、さらに講演者の考え方と実際の研究を紹介する。

### 2. 医療デバイスの現状

現在、臨床に应用されている高分子系医療デバイスとしては、人工腎臓(透析膜)、人工肺、補助人工心臓、コンタクトレンズなどがある。これらの医療デバイスは、いずれも膜型デバイスであり、材料自身のもつ特性、すなわち高強度性、血液適合性、物質透過性および光学特性、を主体に構築されている。それぞれのデバイスでは、(高分子)材料に対する要求特性は明確であり、それに併せて研究者の創意工夫を取り入れて発展してきた。

例えば、人工肺については、酸素付加についての性能が要求され、それは透過性が高ければ高いほど、優れた人工肺用膜として価値が認められてきた。しかし、人工肺の基本構造は、100%酸素ガスから血液への酸素分子が移動するものであり、酸素分子の濃度勾配をこれ以上に高めることは困難である。また、酸素分子の人工肺用膜の透過性とは、膜の特性としては、酸素分子の物質移動抵抗と言い換えることが出来る。現在用いられている人工肺用膜の酸素分子の物質移動抵抗値は十分に低く、ほぼ酸素ガスと直接に接触している状況に近い。それにもかかわらず、人工肺の性能は、生体肺の機能にまったく追いついておらず、高い酸素付加能に対する要求は依然として高い。このような状況の原因は、人工肺用膜の物質移動抵抗は、ほとんどがその境膜抵抗であることに起因している。境膜抵抗は血液流れに影響される値であり、乱流の度合いを表すレイノルズ数の増加とともに小さくなる。しかし、血球破壊の危険性を考慮すると、乱流度合いの増加には制限があり、このことが人工肺の性能向上の足かせとなっている。境膜抵抗は材料特性に依存しないと報告されており、何かしらの新しい工学要素が必要とされている。



近年、注目されている医療デバイスとしては、薬物溶出型ステント、埋め込み型徐細動器 (ICD)、および核磁気共鳴診断装置、ポジトロンエミッショントモグラフィ (PET) がある。いずれも我が国の政策上、重要課題として推進されているものであるが、高分子材料の重要度としては低いものである。また、高分子に限らず、材料自体の特性に依存しているものではなく、電気・電子・情報および機械工学の複合産物であることが特徴である。

### 3. 医用高分子についての考察

これまで、医用高分子の開発戦略は、医療側のニーズを把握し、これを実現するために、すでに実現している素材を基盤にして、ニーズに適応する改良を加える、というものであった。多くの研究者が指摘する、いわゆるレディメイドもしくはテーラーメイド型医用材料である。この開発戦略は、短時間で医療行為に必要な性能を備えたデバイスを開発するためには有効な方法であり、今後も医用材料開発の普遍的な方法論であり得ると考えられる。ただし、この戦略を有効たらしめるためには、工学研究者と医療側との密接な情報交換と議論が必要であり、両者が共通に情報交換の可能なプラットフォームの整備もひとつであろう。一方、医療側のニーズに応えるために、全く新しい材料を開発する、いわゆるオーダーメイド型の開発戦略はこれまであまり執られてこなかった。これは開発に時間がかかることと、医療側のニーズを満たすための基礎的な方法論から構築する必要があり、これを実現するための基盤整備が行われてこなかったことも原因の一つである。これを打開するためには、細胞生物学や分子生物学が現代医療の基盤となっているのと同じく、材料工学も医療の基盤となるべく、基礎的な研究や材料もしくは材料特性のデータベース化などを進める必要があると考える。これが進めば、新しい材料から発想される医療、という成果も上がることが期待される。基礎的な研究には、界面反応、生体コロイドとの相互作用、力学的特性の影響、長期成績の推測法など多くの未解決の問題点の解明が挙げられる。

密接な連携が望まれている医療分野に、再生医療および遺伝子医療がある。先にも述べたように、再生医療との連携については、生分解性高分子が主に用いられているが、今後、再生に関わる細胞の機能解析などが進むと、材料に対する新しい要求が生まれてくることが考えられる。また、感温性高分子を用いた細胞シートによる再生医療は、材料が主体となって新しい再生医療を実現している数少ない例である。遺伝子医学については、遺伝子多型の迅速解析や遺伝子治療のための非ウイルス性ベクターの開発が挙げられる。これらの分野については、新しい高分子材料が多種、提案されており、今後の発展が期待される。

一方、従来からの医療側からの要請については、ガン、心疾患、脳疾患のいわゆる成人病三大疾病に対する新たな治療法の要求、例えばDDS、小口径人工血管などが挙げられる。さらに患者が増え続けている腎不全、糖尿病、骨粗鬆症および要介護人口を減少させるための認知症などの対策に対応する技術が望まれている。また、医療費の削減、QOLの向上、僻地医療などの社会的要請に対応する技術も望まれている。

### 4. 医用高分子の将来について

これらの状況を鑑みて、筆者等は次世代の医療デバイス開発のための基礎研究として、1) 生体相互作用の基本的理解、2) 新しい工学技術の提案、3) 問題解決型研究、につ

いて実施している。これらについて、簡単に紹介する。

#### 4-1. 生体相互作用の基礎理解

人工材料が生体と接触した場合の、生体側あるいは材料側の反応について詳細な検討が必要である。特に、医療用途への応用を目指すためには、経時的な変化についても検討する必要がある。生体側の反応については、これまでに細胞接着・増殖性および細胞内のメッセンジャーRNAの発現解析等を行ってきた。最近では、新しく報告された表面開始リビングラジカル重合を用いて、精密制御された表面を作成し、タンパク質吸着の詳細な検討を行っている。特に、表面が分子が運動の自由度を有する場合には、表面の2次元の性質だけでなく、深さ方向への分配エネルギーをも考慮する必要があることを明らかにした。

#### 4-2. 新しい工学技術の提案

①微小振動表面の応用：再生医学・細胞工学において細胞の分化や組織形成等を人為的に制御できれば、初代培養細胞や幹細胞等の数少ない細胞の量的な確保等に有用である。これまでに細胞膜あるいは細胞骨格に存在するタンパク質が細胞機能の発現に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。筆者らは、ナノ振動という工学的手法を用いて細胞の増殖や分化、及び組織形成などのシグナルを人為的に認識させ操作することを試みている。機械的微小振動を細胞に与えるための装置を開発し、種々の細胞について細胞の接着への影響、分化、増殖などへの影響を解析した。その結果、ヒト血管内皮細胞を用いた実験では、初期接着が改善されることが確認された。細胞増殖についても促進されることが明らかとなった。

②超高压処理を用いた水素結合性分子集合体の応用：6000気圧以上の超高压処理により、水酸基をもつ合成高分子・ポリビニルアルコール (PVA) と DNA (デオキシリボ核酸) との複合体の形成に成功した。形成した複合体を用いた培養細胞への遺伝子導入も確認しており、大きなサイズの DNA を細胞に導入するための新しいベクター (運び手) として遺伝子治療への応用が期待される。筆者等は、超高压下では分子の水素結合性が高くなり、水素結合性構造体を形成しやすいことに着目し、DNA に非イオン性ポリマーを結合させた複合体を形成できると考えた。そこで、側鎖に水酸基を有する最も単純な構造のポリマーである PVA をモデル物質として、超高压下での複合体形成を試みた。複合体形成の過程で水素結合性高分子が集合化し、ハイドロゲルが得られることも明らかになった。ゲル形成の条件を調べてみると、高濃度・高圧・長時間であるほど、ゲル形成が進むことが分かった。このような条件では、分子間相互作用がより大きくなり、高分子同士の架橋が進むからと考えられる。

#### 4-3. 問題解決型研究

人工弁についてはすでに臨床で広く使用されており、成功した医療デバイスであるといえる。しかし、QOLあるいは適用の狭さ (小児患者には負担が多きい) などから、長期使用が可能で、かつ成長性を有する人工弁が望まれている。特に後者の要求を実現するためには、再生医療技術を用いることが必須である。現在、心臓弁の再生に関して研究されているスキャフォールド材料としては、吸収性縫合糸等で利用されているポリグリコール酸やポリ乳酸等の生体内分解吸収性人工材料と、同種あるいは異種心臓弁組織からドナー由来細胞を除去した脱細胞化マトリックスとがある。

人工材料製スキャフォールドを用いた代表例として新岡らの報告がある。脱細胞化マト

リックスを用いた先駆例としては、米国 CryoLife 社による SynerGraft 心臓弁がある。1999 年から脱細胞化ブタ大動脈弁の臨床使用を開始し、2001 年には世界初の再生型心臓弁と称して欧州で市販を開始した。移植後数ヶ月間で自己細胞が組織内に浸潤し、自己組織化すると報告しているが、移植後に破断の生じた例も報告されている。ドイツ・ハノーバー医科大学の Haverich らは、1998 年より異種生体弁から動物由来細胞を除去し、代わりにレシピエントの自己血管内皮細胞を播種する動物実験を行い、界面活性剤である Triron X-100 やタンパク分解酵素であるトリプシン溶液を細胞除去に用いている。英国リーズ大学の Ingham らは種々の薬液で細胞除去効果を検討し、SDS が最も細胞除去に適していると報告している。また、ドイツ・フンボルト大学の Konertz らはヒツジを用いた 6 ヶ月間の実験で、脱細胞化ブタ肺動脈弁に自己内皮細胞を播種することで弁の変形や石灰化も見られなかったと報告しており、臨床使用も開始している。

我々は 2000 年から、脱細胞化した生体弁に患者自身の細胞を組み込むテーラーメイド心臓弁の開発を開始した。生物組織を選んだのは、以前から凍結保存同種弁の臨床使用に取り組んできたことと、心臓弁の複雑な形状を人工材料で造形することが容易でないこと、及び人工材料は生体よりも硬いために生体と同等の力学特性を持たせるのが難しいと考えたためである。免疫反応の主因を成すドナー由来細胞を除去し、コラーゲン線維や弾性線維などの構造マトリックスからなる脱細胞化スキャフォールドに患者の自己細胞を組み込むことで、生体適合性を高めるとともに、自己修復性や成長性を有する代用弁が創製できると期待できる。このためには、完全な脱細胞化処理法の開発が必要であり、筆者等は超高压処理を用いた新しい技術を提案している。

## 5. まとめ

以上のように、医療デバイスに必要とされる技術としての医用高分子材料の考え方について、筆者の考えを紹介した。我が国の高分子化学技術は世界的にみても高い水準にあり、独創的なアイデア、緻密な合成技術などを有している。また、電子工学、情報工学、機械工学等においても世界をリードする実力を備えている。同じ工学分野でありながら、これらの学問領域と綿密な連携があったとはいえなかった。新しい医療デバイスの開発のためには、異種領域の研究交流が必須であり、我々、高分子科学者が中心的役割を果たす未来を期待している。

## 謝辞

脱細胞化組織の研究は、国立循環器病センター研究所再生医療部室長藤里俊哉博士との共同研究である。アパタイト複合化の研究は、国立循環器病センター研究所生体工学部室長古菌 勉博士との共同研究である。分子ブラシ表面へのタンパク質吸着の研究は、京都大学化学研究所の吉川千晶博士、辻井敬亘助教授、福田 猛教授との共同研究である。また、研究の一部は、厚生労働科学研究費、循環器病研究委託費事業、創薬等ヒューマンサイエンス研究事業、経済産業省地域コンソーシアム事業、科学技術振興調整費補助金および日本学術振興会科学研究費補助金の補助を受けて行われました。

# IP1-31 Quick touch 術式効果の工学的評価と超音波メス制御方式の検討

## Engineering evaluation of the quick touch operation and development of ultrasonically activated scalpel control method

○能田 高行, 増澤 徹\*, 樋上 哲哉\*\*, 岸田 晶夫\*\*\*, 佐藤 裕一郎\*\*\*\*  
茨城大学 理工学研究科 機械工学専攻, \*茨城大学 工学部 機械工学科

\*\*島根大学 医学部 循環器消化器総合外科学

\*\*\*東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, \*\*\*\*株式会社 ミワテック

Takayuki Noda, Graduate school of Sci. and Eng., Ibaraki University,

\* Toru Masuzawa, Dept. of Mechanical Engineering, Ibaraki University,

\*\*Tetuya Higami, Surgery and Cardiovascular Surgery, Shimane University,

\*\*\*Akio Kishida, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,

\*\*\*\*Yuichirou Satoh, Miwatec

1. **緒言** 冠動脈バイパス手術で使用されるグラフトは、形状、長期開存性などが良好な内胸動脈が最適とされているが、剪刀や電気メスを用いた動脈剥離には時間がかかるという欠点がある。その欠点を補うため、超音波メスを手動で約5Hzの周波数で振動させ微妙な出力調整を行う Quick touch 術式<sup>1)</sup>が考案され好成績を収めているが、その熟達には個人差があり術者が限られている。また、超音波メスによる脂肪剥離、組織癒着などの現象も十分に解明されているとは言えない。そこで本研究では超音波メスにより生じる諸現象を解明し、Quick touch 術式と同等の効果を實現する超音波メス制御方式の開発を目標としている。今回、本研究の一環として、周波数 25kHz、振動振幅 30~180 $\mu$ m の超音波メスの、超音波振動周波数、荷重状態、発生温度などのパラメータをリアルタイムで計測、解析するシステムを構築したので報告する。

2. **方法** Quick touch 術式では、メスの刃先に発生する摩擦熱で内胸動脈に熱損傷を生じさせないように、刃先を細かく手動振動させることにより温度を制御していると考えられる。そこで組織への押し当て力や時間と関係がある刃先発熱を計測するために超音波メス基礎現象計測装置を開発した(Fig.1)。本装置ではマイクロメータに取り付けた超音波メス(ミワテック製)を直動運動させ、対象物に与圧する。また、荷重を計測するため、荷重変換器をメス先の直動運動方向に取り付けた。

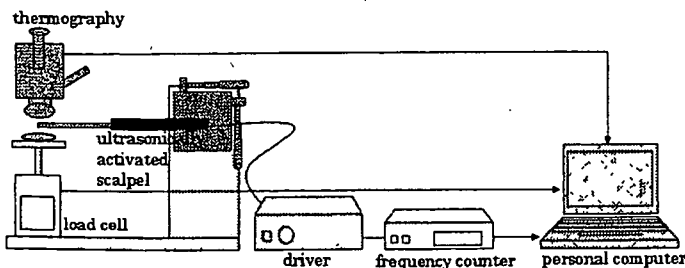


Fig.1 Measurement system for ultrasonically activated scalpel

また、今回、術中に超音波メス刃先の温度をリアルタイム計測する方法として共振周波数を用いた温度計測法を考案した。本法は発熱により音波の刃先伝達特性が変化することを利用

したものである。超音波メスは共振点で駆動されており、刃先伝達特性が変化すると共振周波数も変化することになる。超音波メス基礎現象計測装置にて刃先温度と共振点の関係を検討した。豚肉に当てた超音波メス先の温度をサーモグラフィで、共振周波数を周波数カウンタで計測した。実験条件は、振動振幅 180 $\mu$ m、荷重 100gf、時間 20s とした。

3. **結果および考察** Fig.2 にメス先に生じる温度に対する共振周波数測定を示す。メス先の温度が 28.7 $^{\circ}$ C から 36.9 $^{\circ}$ C まで変化したのに対して、共振周波数は 25.405kHz から 25.367kHz まで線形に変化した。近似式としては  $y = -0.0061x + 25.587$  となり、1 $^{\circ}$ C 上がると 6Hz 下がった。これはメスの材質であるチタンの温度が上がり、チタン固体中の音速が小さくなることによって周波数が低くなるためと考える。本結果より、共振周波数からメス先の温度を推定することが可能であることが判明した。

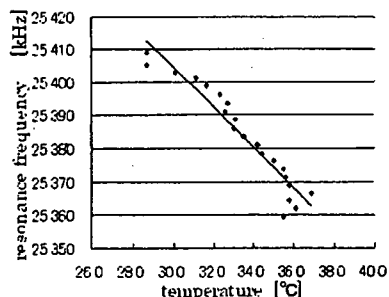


Fig.2 Relationship between of temperature and resonance frequency

4 **結言** 本研究では、Quick touch 術式と同等の効果を實現する超音波メス制御方式の開発の一環として、刃先の温度と共振周波数の関係を評価した。基礎実験の結果、温度と共振周波数の関係は線形性を示し、共振周波数から温度を推定できることを確認した。今後、荷重による周波数への影響を考慮し、制御方式の検討を行っていく。

**参考文献** 1) 樋上哲哉、超音波メスによる新しい内胸動脈採取法、金芳社、2004

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金の支援のもと行われた。

# 1A2-A5 ナノ微小振動と細胞

## Nano-vibration and Cells

○増澤 徹, 草間淳, 木村孝之, 柴田隆行\*, 岸田晶夫\*\*, 木村剛\*\*

茨城大学 工学部, \*豊橋技術科学大学 生産システム工学系

\*\*東京医科歯科大学 生体材料工学研究所

Toru Masuzawa, Jun Kusama, Takayuki Kimura, School of Engineering, Ibaraki University,

\*Takayuki Shibata, Toyohashi University of Technology,

\*\*Akio Kishida, \*\*Tsuyoshi Kimura, Tokyo Medical and Dental University,

1. **緒言** 我々はナノメートルオーダーの微小振動刺激が細胞に与える影響を検討している。そのために、数百ナノメートル〜数マイクロメートル、10 Hz から 20 kHz の微小振動を培養シャーレに加えるシステムの開発、それを用いた細胞実験を行ったので報告する。

2. **方法** 図1に水平方向微小振動負荷装置の外観図を載せる。本装置では振動子にピエゾ素子を用い、振動板に設置し培養シャーレごと振動負荷を与える構造となっている。振動振幅は振動板に振動子と直列に設置された計測用ピエゾ素子で計測、フィードバック制御をかけることで各周波数で振動振幅数 100nm〜1 μm の安定した振動特性を実現している。振動負荷装置本体の大きさは 240mm x 150 mm で、インキュベータ内に設置し振動負荷可能とした。また、水平方向、垂直方向、2種類の振動負荷装置を開発した。本装置を用いて、微小振動刺激が細胞に与える影響を検討した。実験にはマウス胎児線維芽細胞(MEF)とマウス線維芽組織由来細胞(L929)を用いた。細胞をシャーレにまき、接着過程で微小振動刺激を与える接着能評価試験と細胞がシャーレ底面に接着した後に刺激を与える増殖能評価試験を行った。双方の実験共に振動負荷時間は60分とし、振動周波数は0Hz(control), 10Hz, 100Hz, 1kHz, 10kHzとした。接着能評価試験では振動負荷終了後、すぐに接着した細胞数をカウント、増殖能評価試験では振動負荷後、無振動で培養し、2日後の細胞数をカウントし、無振動負荷結果と比較した。

3. **結果および考察** MEF では水平、垂直方向共に振動周波数に関わりなく微小振動刺激により有意に接着能が亢進することを確認した(図2, 3)。増殖能に関しては水平方向振動では10kHz(図4)、垂直方向振動では100Hzの振動刺激で有意な亢進が見られた。一方、L929では増殖能に対する振動刺激の影響を見られなかった。

4. **結言** 細胞実験の結果、微小振動刺激は細胞増殖能や接着能に影響を与えること、振動刺激方向や細胞の種類により振動刺激の影響度合いが違うことが判明した。

本研究の一部は厚生労働科学研究費補助金の支援のもと行われた。

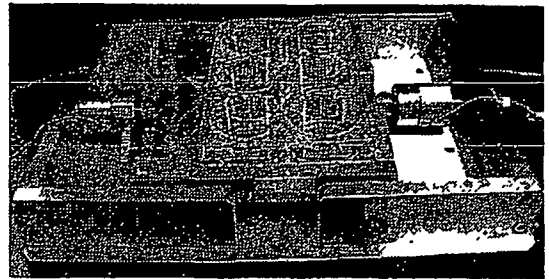


Fig.1 Nano-vibration generator (Horizontal vibration type)

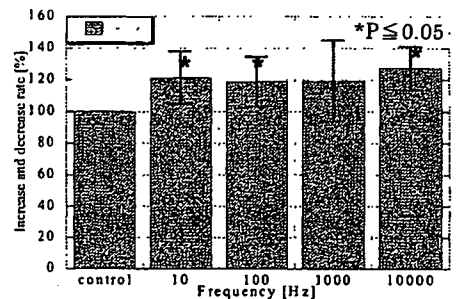


Fig.2 Adhesion experiment results (MEF, Horizontal vibration)

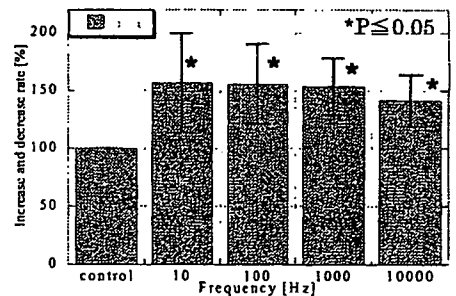


Fig.3 Adhesion experiment results (MEF, Vertical vibration)

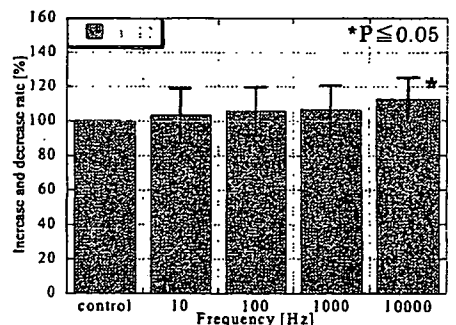


Fig.4 Multiplication experiment results (MEF, Horizontal vibration)

# 人と福祉を支える 技術フォーラム 2006



4 March 2006

ライフサポート学会

日本生活支援工学会

日本生体医工学会専門別研究会

# 超音波メス制御による手術支援に関する研究

## Operation assist by using ultrasonically activated scalpel

○濱口 崇志、能田 高行、加藤 綾子\*、岸田 晶夫\*\*、木村 剛\*\*、樋上 哲哉\*\*\*、増澤 徹  
 茨城大学、\*財団法人 医療機器センター、\*\*東京医科歯科大学、\*\*\*札幌医科大学

### 1. はじめに

冠動脈バイパス手術はグラフトと呼ばれる別の部位から摘出した血管を使用し、冠動脈の閉塞部分にバイパス血行路を作る手術である。近年では、内胸動脈の一端をこの下流に縫合する手術方法で好成績を収めている。この場合、体内に埋まっている内胸動脈の剥離が必要である。そのため、超音波メスを用いたクイックタッチ術式が考案された。クイックタッチ術式は、血管を損傷させずに剥離を行うため、超音波メスを手動で約5 [Hz]の周波数で振動させ微妙な出力調整を行う術式である。そのため、その施行には一定の熟練が必要で誰にでも行えるわけではない。そこで、本研究ではクイックタッチ術式が主に超音波メス刃先温度の調整をしていると考え、超音波メス刃先温度推定方法の提案及び、超音波メス刃先の温度に注目した手術支援のための超音波メス制御方式の検討を行った。

### 2. 原理

超音波メスは電圧をかけることで伸縮する PZT を振動子に用い、PZT より発生する振動をホーンで増幅し、チップに伝えるという仕組みをとっている。チップの先端である刃先はチップの共振により最大振幅をとる。そのため、超音波メスは共振周波数で動作させる。

本研究で用いる超音波メスのチップ材質は Ti-6Al-4V である。Ti-6Al-4V は温度上昇によりヤング率  $E$  が小さくなる。ヤング率  $E$  が小さくなると密度  $\rho$  はほぼ変化しないので、1 式よりチップ内音速  $c$  が遅くなる。超音波メスは波長  $\lambda$  を一定にするために、2 式から温度上昇に伴いより低い共振周波数  $f$  で動作することになる。

$$c = \sqrt{\frac{E}{\rho}} \dots (1) \quad f = \frac{c}{\lambda} \dots (2)$$

これより、超音波メスの共振周波数から刃先温度推定が可能であると考えた。

### 3. 計測システム概要と実験

共振周波数からの刃先温度推定の可能性を検証するため、Fig. 1 に示す超音波メス現象観察システムを構築した。超音波メス現象観察システムでは垂直に保持した超音波メスに一定負荷がかけられる構造とした。

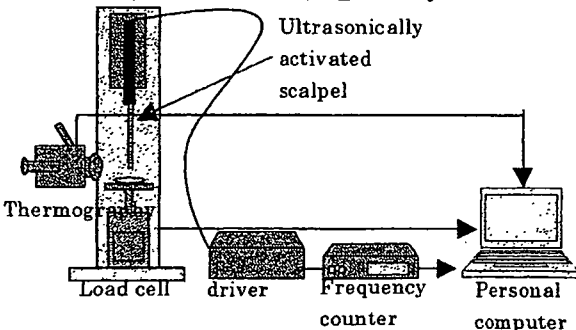


Fig. 1 Measurement system for ultrasonically activated scalpel

まず、クイックタッチの負荷を検証するため、電子秤の上に豚の大動脈のをせ、クイックタッチの動作を行った。

その結果、負荷は 10~30 [gf] の範囲に収まり、平均負荷は 16.3 [gf] であった。そこで、超音波メス現象観察システムを用いて、豚肉の赤身を試料とし、2.5~16.4 [gf] の平均負荷をかけてチップ平均温度と共振周波数の関係を観察した。チップは超音波メス(Fig.2)の振動部を指す。

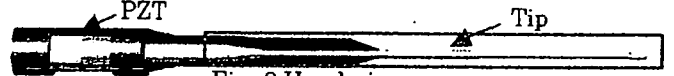


Fig. 2 Hand piece

### 4. 結果および考察

チップ平均温度と共振周波数の関係を Fig. 3 に示す。Fig.3 より、チップ平均温度が上昇すると共振周波数が低くなり、チップ平均温度と共振周波数の関係は比例していることが分かった。近似直線は(共振周波数) =  $-4.3 \times (\text{温度}) + 25329$  であった。そこで、チップ平均温度と刃先温度の関係を Fig.4 に示す。

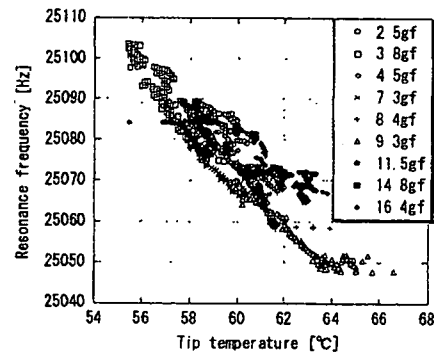


Fig. 3 Relationship between tip temperature and resonance frequency

Fig.4 より刃先温度はチップ平均温度に比例していることが分かる。この関係の近似直線は(刃先温度) =  $0.13 \times (\text{チップ温度}) + 53.8$  であった。よって、共振周波数よりチップ平均温度を推定し、チップ平均温度から刃先温度推定することによって、刃先温度を基準温度より常に低く制御出来ると考える。

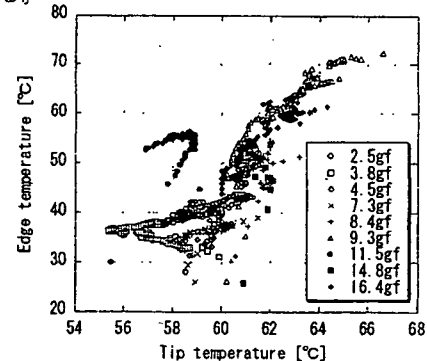


Fig. 4 Relationship between tip temperature and edge temperature

### 5. まとめ

チップ平均温度が上昇に比例して共振周波数が低くなることを確認した。加えて、チップ平均温度と刃先温度が比例関係にあることを確認した。今後、共振周波数から刃先温度を推定し、振動振幅制御による刃先温度の制御を行う。

**P-155 細胞機能制御を目指した種々の細胞への機械的微小振動に関する研究**

伊藤由樹子<sup>1</sup>, 大富美智子<sup>1</sup>, 草間 淳<sup>2</sup>, 増澤 徹<sup>2</sup>, 南 広祐<sup>3</sup>, 木村 剛<sup>3</sup>, 藤里俊哉<sup>4</sup>, 岸田晶夫<sup>3</sup>

<sup>1</sup>東邦大学 理学部生物分子科学科, <sup>2</sup>茨城大学 工学部 機械工学科, <sup>3</sup>東京医科歯科大学 生体材料工学研究所, <sup>4</sup>国立循環器病センター研究所 再生医療部

[緒言] 再生医療においては、細胞機能の維持・制御が必要である。サイトカイン等の液性因子による方法が主流であるが、静水圧付加、流れのズリ応力などの物理的手法も導入されている。我々は、ナノメートル領域の振幅を与える基盤上で細胞を培養する微小振動培養法を検討している。これまで、繊維芽細胞、骨髄細胞への微小振動付加により接着、増殖が促進されることを報告した。本研究では、神経細胞の諸機能および種々の細胞への遺伝子導入への微小振動の影響について検討した。[実験] 細胞としてPC12、神経幹細胞、L929、マウス胎児繊維芽細胞およびラット骨髄細胞を用いた。遺伝子としてプラスミドDNAを用いた。電圧アクチュエータを振動子とする微小振動付加装置を作製した。周波数可変能を有し、周波数に応じた振幅で振動する。コラーゲン、ラミニンなどで表面処理した培養基材を装置に装着し、種々の周波数で振動し、細胞の形態、遺伝子導入効率等を評価した。[結果と考察] 種々の培養基材へのPC12細胞の接着性と神経分化について検討した。いずれも、振動無付加時に細胞接着が確認され、また、振動付加時においても十分な接着が示された。また、神経成長因子の添加により細胞の形態が変化し、神経突起の成長が認められた。遺伝子導入についても合わせて報告する。厚生労働省科学研究費ならびに経済産業省地域新生コンソーシアム研究事業費の補助を受けて行われた。



## **Cell function control by nano vibrations**

**Jun Kusama**

Graduate School & Engineering Ibaraki University, Hitachi, Ibaraki-Pref., 316-8511 Japan  
nm4412f@hcs.ibaraki.ac.jp

**Takayuki Kimura**

Dept. of Mechanical Eng., Ibaraki University, Hitachi, Ibaraki-Pref., 316-8511 Japan

**Takayuki Shibata**

Toyohashi University of Technology, Toyohashi, Aichi-pref, 441-8580 Japan

**Akio Kishida**

Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University, Kanda, Tokyo, 101-0062 Japan

**Toru Masuzawa**

Dept. of Mechanical Eng., Ibaraki University, Hitachi, Ibaraki-Pref., 316-8511 Japan

### **ABSTRACT**

The horizontal and vertical nano-vibration stimuli devices have been developed to study the influence on the cell functions. The adhesion and multiplication performance under the nano-vibration stimuli were examined by using the MEF cells and the L929 cells. The adhesion and multiplication performance of the MEF cells was improved with the nano-vibration. The adhesion performance increased by 50 % with the vertical stimuli, the multiplication enhanced by 13 % with the horizontal stimuli. In contrast, the influence of the nano-vibration on the L929 cells was not observed. It is confirmed that the nano-vibration could influence the cell functions and the cell sensitivity to nano-vibration stimuli is different among the cell sources.

### **INTRODUCTION**

Shortening of the cell culture is one of requirements to increase the efficiency of the regenerative medicine. And, the increase of gene transfer efficiency is also required in the field of bioengineering. Such improvements are related to the cell function regulation with stimuli by using drugs and other physical signals.[1] It is reported that some receptors on

the cell membrane have sensitivity to the mechanical stimulation.[2]-[7] We suppose that the mechanical oscillation under ultra sound frequency is a candidate of such cell stimuli. In this paper, we report two vibration devices which give the culture cells the oscillation stimuli with nano-meter ordered amplitude and report nano vibration influence on the cell.

### **METHOD**

#### **Development of the nano vibration devices**

The specialized devices that produce the nano-meter ordered mechanical vibration to the culture cells have been developed in our laboratory. One of the devices is horizontal vibrator that the vibration direction is horizontal, and the other is the vertical vibrator that the vibration direction is vertical.

#### **Horizontal vibrator**

A schematic diagram of the horizontal vibrator is shown in Fig.1. Commercially available piezoelectric element (NEC TOKIN CO. AE0203D08) is adopted as a vibration source of developed actuator. The cell culture dish is set on the culture dish setting plate and oscillated. The vibration motion of the actuator

is transferred to the plate horizontally. The frequency response of the device is shown in Fig.2. The device could produce up to a vibration frequency of 32 kHz and the range of the oscillation amplitude is from 150 nm to 3,000 nm.

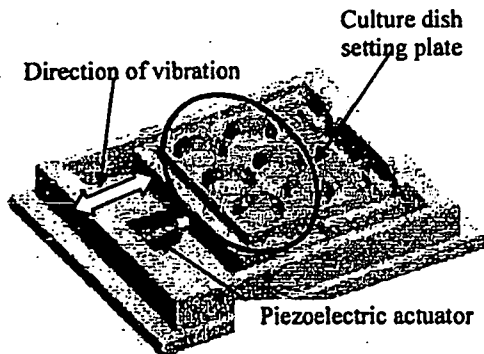


Fig.1 Horizontal vibrator

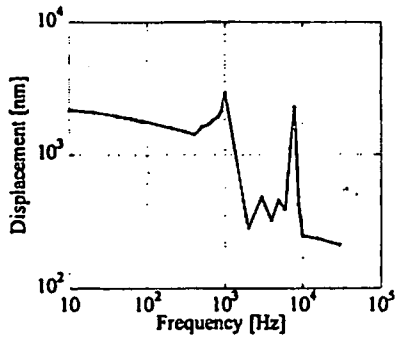


Fig.2 Response of horizontal vibrator

### Vertical vibrator

A schematic diagram of the vertical vibrator is shown in Fig.3. The vibration motion is transferred vertically in this device. The frequency response of this device is shown in Fig.4. The device could produce up to a vibration frequency of 10 kHz and the range of the oscillation amplitude is from 15 nm to 16,000 nm.

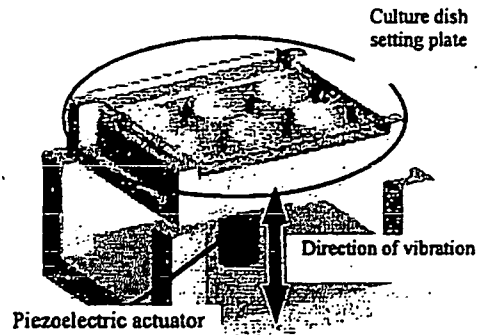


Fig.3 Vertical vibrator

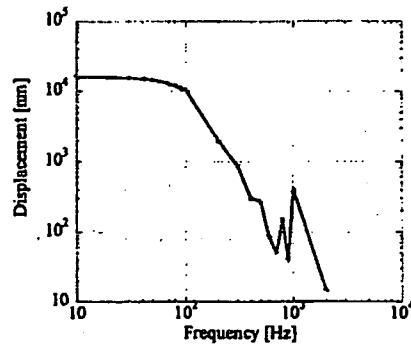


Fig.4 Response of vertical vibrator

### Experiments

The culture experiments to evaluate the influence of the mechanical vibration stimuli were carried out by using both developed vibrators. The MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) cells were used as culture cells for the experiment. Firstly, the influence of the nano-vibration to adhesion performance was evaluated. The cells were equally scattered on a culture dish and the nano-vibration was delivered during adhesion sequence for an hour in the incubator. After the vibration delivering, the number of the adhesion cells was counted. Non-treated dishes were used for the adhesion experiment to enhance the result. Secondly, the influence to the multiplication was evaluated. The nano-vibration was delivered to adhered cells for an hour in the incubator. After delivering nano-vibration, the cells were cultured for two days, and the multiplied cell number was counted. Treated dishes were used

for the multiplication experiment. The L929 (mouse fibroblast) cells were also used for multiplication experiments to check the cell difference. The delivered vibration frequencies were 0 Hz as control study, 10 Hz, 1 kHz, and 10 kHz. The maximum vibration amplitude of each frequency was delivered. The incubator environment was maintained at a temperature of 37 degrees of centigrade, a CO2 concentration of 5 %, and a humidity of 100 %.

## RESULTS AND DISCUSSION

Fig.5 and 6 show the results of the adhesion experiments by using the MEF cells. The adhesion ratio of the control study is indicated as 100 %. The adhesion performance was improved in all range of the nano-vibration frequency. The vertical stimuli influenced adhesion performance by 50 % significantly. The results of the multiplication experiments are shown from Fig. 7 to Fig.10. The multiplication ratio of the control study is indicated as 100 %. The result with the MEF cells are shown in Fig. 7 and 8, and the results with the L929 cells are shown in Fig. 9 and 10. The horizontal vibration stimulus with a frequency of 10 kHz influenced the multiplication performance in the MEF cells experiments. Also, the vertical stimulus with a frequency of 100 Hz increased the multiplication of the MEF cells significantly, whereas there was no multiplication improvement on the L929 cells. These results are summarized in table 1. A mark “+” is indicated that the influence was observed and a mark “-“ is indicated that the influence was not observed.

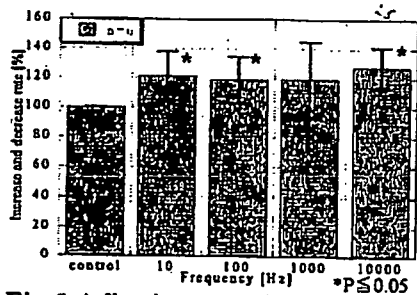


Fig.5 Adhesion experiment results (MEF, Horizontal vibration)

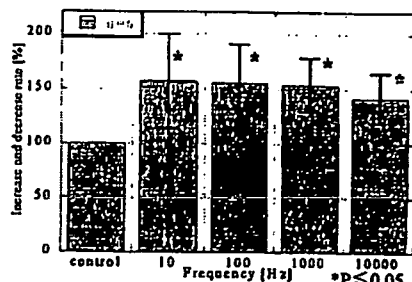


Fig. 6 Adhesion experiment results (MEF, Vertical vibration)

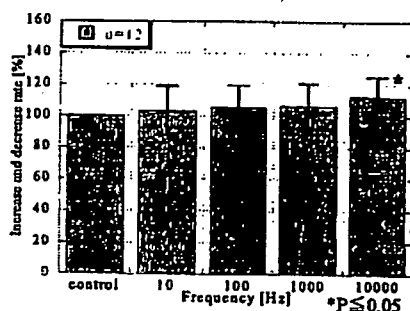


Fig.7 Multiplication experiment results (MEF, Horizontal vibration)

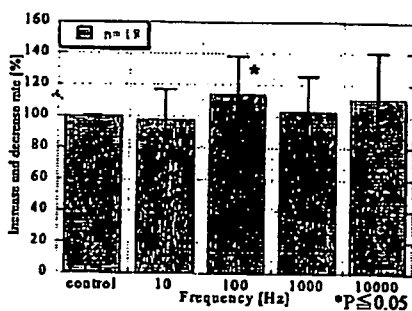


Fig.8 Multiplication experiment results (MEF, Vertical vibration)

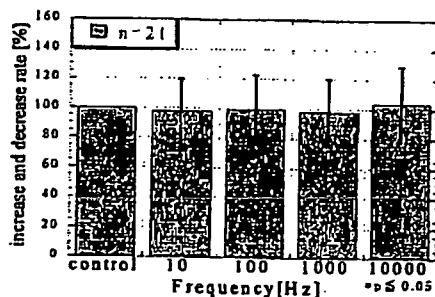


Fig.9 Multiplication experiment results (L929, Vertical vibration)

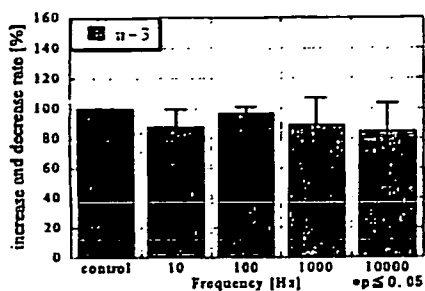


Fig.10 Multiplication experiment results (L929, Horizontal vibration)

Table 1 Resultant of the experiment

Adhesion		Multiplication		
Horizontal	Vertical	Horizontal	Vertical	
+	+	+	+	MEF
-	-	-	-	L929

The nano-vibration stimuli influenced adhesion and multiplication performance of the MEF cell. However, the influence on the multiplication performance of the L929 cells could not be observed. It is confirmed that the nano-vibration could influence the cell functions and the stimulus sensitivity of the cells to the nano-vibration is different with the vibration direction. Also, the stimulus sensitivity is different among the sources of the cell.

## CONCLUSION

The horizontal and vertical nano-vibration stimuli devices have been developed to study the influence on the cell functions. The adhesion and multiplication performance under the nano-vibration stimuli were examined. It is confirmed that the nano-vibration could influence the cell functions.

## ACKNOWLEDGEMENT

A part of this work was supported by the Health and Labour Sciences Research Grants.

## REFERENCES

1. Banes, A.J., Tsuzaki, M., Yamamoto, J., Fischer, T., Brigman, B., Brown, T., Mechanoreception at the cellular level: The detection, interpretation, and diversity of responses to mechanical signals, *Biochem. Cell Biol.*, 73, pp.349-365(1995)
2. Thomas D. Brown., Techniques for mechanical stimulation of cells in vitro: a review, *Journal of Biomechanics* 33 pp.3-14(2000)
3. Shigeo M. Tanaka, A new mechanical stimulator for cultured bone cells using piezoelectric actuator, *Journal of Biomechanics* vol.32 pp.427-430(1999)
4. Anthony Russo, Albert Banes, Michell Elfervig, Mari Tsuzaki, Satoru Yamazaki, Paul Weinhold, Joe Minchew, The effect of vibration on annulus cell signaling, *Proceedings of the NASS 16 Annual Meeting / The Spine Journal* 2 vol. 2 pp.3S-44S(2002)
5. C. R. Jacobs, C. E. Yellowley, B. R. Davis, Z. Zhou, J. M. Cimbala, H.J. Donahue, Differential effect of steady versus oscillating flow on bone cells, *Journal of Biomechanics* vol.31 pp.969-976(1998)
6. E. Tanck, W. D. van Driel, J. W. Hagen, E. H. Burger, L. Blamkevoort, R. Huiskes, Why does intermittent hydrostatic pressure enhance the mineralization process in fetal cartilage? *Journal of Biomechanics* vol.32 pp.153-161(1999)
7. Michael S. Goligorsky, Mechanical stimulation induces  $Ca^{2+}$  transients and membrane depolarization in cultured endothelial cells, *FEB LETTERS* vol.240 No.1,2 pp.59-64(1988)