

研究種目：共同研究 研究期間：平成 26 年 10 月～平成 27 年 3 月
 研究課題名：血管様構造を有する大型組織体の自動構築システムの開発
 ラボ長
 所属：システム創成専攻・システム科学領域
 氏名：洞出 光洋

研究成果（当初の研究目的と得られた結果を記載してください。図表を含め 2 ページ程度）：

研究目的

本研究の目的では、移植用途の機能的な立体組織や立体臓器の「自動化された製造技術」を開発することである。具体的には、自動化された精密配置を実現する微細加工技術およびマイクロロボット技術と細胞に穏和な機構でゲル化・ゲルの分解が可能な素材および、それらを利用して実現される迅速な組織体集積技術を融合させることにより、生体においては各細胞の機能発現・動態に大きな影響を与えている異種細胞間の相互作用が存在する状態を再現しつつ、培養液の流通が可能な血管様構造を含有する細胞のみから構成される厚さ 5 mm 以上の組織体を自動構築する技術を開発することを目的とする。

組織体を精密に配置する技術の開発

チューブ状組織体及び球状組織体を、基板上に精密に配置する技術を開発する。本研究の対象としている動物細胞から構成される組織体は非常に柔らかいものであり、ヒトの手により扱う場合には力の加減など細心の注意が必要である。また、産業化を考えた場合には、この工程はロボットを用いた操作にて行うことが望ましいと考えられる。そこで、大量に用意した球状の組織体を用いて、2次元平面上の任意の位置に配置するシステムを開発する。

2次元任意形状の構築に関しては、局所選択的加熱可能なマイクロヒータアレイデバイスのパターン自由度の高さを利用することで実現させる。そして、温度応答性のゲルの一種である PNIPAAm を添加した細胞懸濁液を用意し、

図 1 に示すように、ロボットアームを用いて、これら様々な形状の細胞を 3 次元状に構築する手法を考案した。

- (1)細胞の位置へマイクロヒータアレイデバイスを移動する
- (2)加熱することでゲル化し細胞を把持する。
- (3)把持した細胞を移動させる
- (4)加熱を止め、ゲルを液体に戻し細胞をリリースする
- (5)同じ手順で細胞の把持・移動を行う
- (6)上記工程を繰り返すことで、三次元組織を構築する

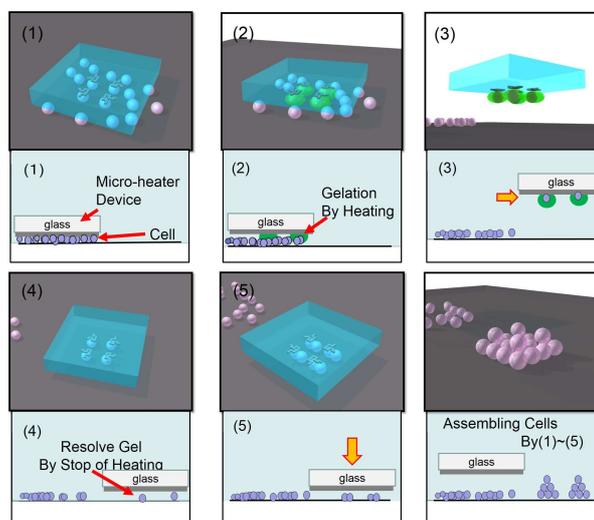


図 1 三次元細胞組織構築手法

上記提案手法をもとに、ゲル化による把持操作手法について検証を行った。3軸のアクチュエータで構成されたロボットアームの裏側にマイクロヒータアレイデバイスを取り付けたシステムを作製した。図2に示すように、提案した手法をもとにスフェロイドを想定した直径97 μm のマイクロビーズの把持操作を行った。アームの移動条件、およびヒータの加熱条件を最適化することで、マイクロビーズ把持・操作・リリースに成功した。本手法の有用性を示す結果を得ることができた。

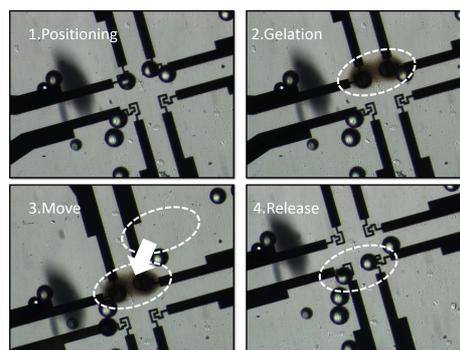


図2 マイクロビーズの把持操作実験

3層構造のゲルファイバー作製に基づく異種細胞層で覆われたチューブ状組織体作製法の開発

3層構造のゲルファイバーを作製する目的は、次年度に実施予定の球状組織体とチューブ状組織

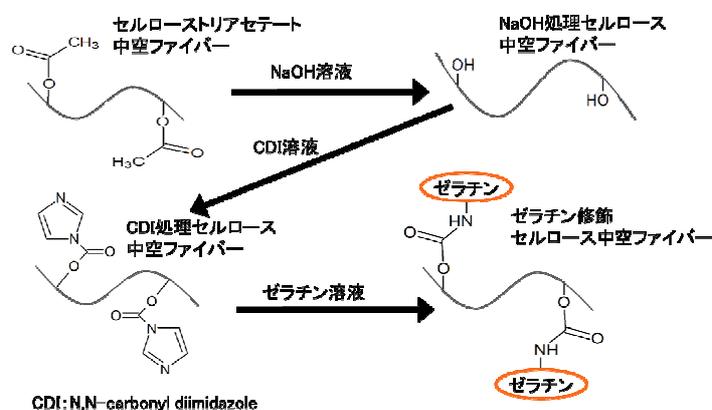


図3 セルローストリアセテート中空ファイバーの修飾スキーム

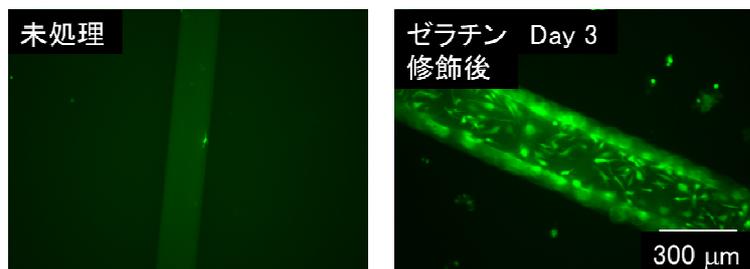


図4 未処理のゼラチン修飾中空ファイバーに血管内皮細胞を播種した後の様子。

着させることを考え、ゲルファイバーに代わる方法の開発を行った。具体的には、直径約400 μm の水の精製などに使用されるセルローストリアセテート中空ファイバーに、細胞接着性を付与し、血管様構造の鋳型として利用することを試みた。東洋紡より入手したセルローストリアセテートファイバーに対して、図3の方法で細胞の接着促進に有効なゼラチンを修飾したところ、図

組織を機械的に集積して3次元組織を作製する際に、生体組織の隅々の細胞にまで酸素や栄養分を供給するためのライフラインとなっている血管網を模倣した構造を作製するためであった。しかし、本チーム内でディスカッションを進めるなかで、球状組織とチューブ状組織を集積してから、生体の血液に相当する培養液をチューブ状組織の内部に流通させるまでに要する時間が、現状では数時間以上必要であり、その間に酸素供給が不足して集積した細胞の多くが死ぬ可能性があることを見出した。これは、ゲルファイバーを分解しなければ、その内部に培養液を流通可能なチューブ状組織が形成せず、その分解に時間を要するためである。

そこで、新たに培養液を流通させながらの球状組織の集積を可能とするために、培養液を流通可能な中空ファイバーに血管構成細胞を生

4に示すように、血管内皮細胞を接着させることができた。また、動物細胞に悪影響を与えずにファイバーを除去して細胞のみからなる血管様組織を作製するために不可欠な、セルロース分解酵素であるセルラーゼによる分解可能性を評価したところ、未修飾のセルローストリアセテートファイバーは分解しなかったが、修飾を行うことにより、セルラーゼによる分解も可能となった。

マイクロピンセットを用いた組織体の強度測定技術の開発

マイクロスケールの対象物をピンセットで把持し、その反力を計測することで、剛性計測が可能である。組織体の配置（毛細血管網の密度）と力学的特性の間に相関関係が生じるのかどうかに関して評価を行うことを目的に、新しい評価法としての可能性を検証する。計測精度を向上させる目的で、ピンセットの先端を板状に平坦化させることに成功した。従来の針状ピンセットと比較して接触面積が上昇し（図5）、反力を増加させることが可能となった。異なるアルギン酸濃度を有するゲルビーズの剛性を計測し、その結果を表1に示す。ピンセットを板状にすることで、対象物の硬さの標準偏差を大きく減少させることに成功した。結果として、柔らかい対象物の剛性計測において、その優位性を示すことができる。

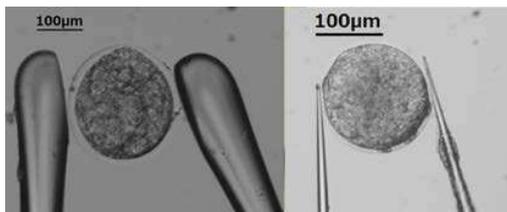


図5 板状・針状それぞれの把持実験

表1 マイクロビーズの把持操作実験

エンドエフェクタの形状	アルギン酸の濃度	平均硬さ [nN/μm ²]	標準偏差 [nN/μm ²]
板状	0.5%	0.243	0.092
	1.5%	0.604	0.166
針状	0.5%	1.211	1.054
	1.5%	4.457	3.124

キーワード：

マイクロロボティクス、MEMS、ハイドロゲル、再生医療、血管新生

研究経費（H26年度）の内訳

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
723,600 円	1,276,400 円	0 円	0 円	0 円	2,000,000 円

共同研究者等

(1) 共同研究者（氏名・所属）

境 慎司 ・ 物質創成／化工 准教授

(2) 研究協力者（氏名・所属・学年（学生の場合））

高田 賢 ・ システム科学科／電子システム学 学部4年

中台 草太・ システム科学科／電子システム学 学部4年

ニヤムドルジ ハンガイ・ システム創成／システム科学 大学院1年

発表論文等（平成 27 年 3 月 31 日現在）

〔雑誌論文〕

1. **Shinji Sakai**, Yang Liu, Mikako Sengoku and Masahito Taya: Cell-selective encapsulation in hydrogel sheaths via biospecific identification and biochemical cross-linking, *Biomaterials*, in press.
2. Tomoaki Ashida, **Shinji Sakai** and Masahito Taya, Propagation of human iPS cells in alginate-based microcapsules prepared using horseradish peroxidase- and catalase-catalyzed reactions, *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, in press.
3. Tomoaki Ashida, **Shinji Sakai** and Masahito Taya: Characteristics of duplex microcapsules prepared from an alginate-derivative polymer via horseradish peroxidase- and catalase-catalyzed reactions, *J Chem Eng Jpn*, in press.
4. **Mitsihiro Horade**, Masaru Kojima, Kazuto Kamiyama, Yasuhi Mae and Tatsuo Arai: Development of a Novel 2-Dimensional Micro-heater Array Device with Regional Selective Heating （投稿中）

〔著書〕

〔学会発表〕

1. **洞出 光洋**、小嶋 勝、神山 和人、前 泰志、新井 健生：ヒータアレイデバイスを利用した微小対象物の任意パターンニング手法の開発（ROBOMECH2015 in Kyoto：2015.5.17-19：発表決定済）
2. **高田 賢**、小嶋 勝、**洞出 光洋**、神山 和人、前 泰志、新井 健生：二次元任意形状の積層による三次元細胞構造の提案（ROBOMECH2015 in Kyoto：2015.5.17-19：発表決定済）
3. **ニャムドルジ ハンガイ**、小嶋 勝、**洞出 光洋**、神山 和人、**境 慎司**、前 泰志、新井 健生：板状エンドエフェクタを用いた細胞剛性計測手法の提案（ROBOMECH2015 in Kyoto：2015.5.17-19：発表決定済）
4. 福島 英、小嶋 勝、**洞出 光洋**、神山 和人、大原 賢一、**境 慎司**、前 泰志、新井 健生：ハイドロゲルファイバを用いた細胞組織構築システム（ROBOMECH2015 in Kyoto：2015.5.17-19：発表決定済）

〔その他〕

科研費 若手研究（A）研究代表者：洞出 光洋 （申請中）

科研費 挑戦的萌芽研究 研究代表者：洞出 光洋 （申請中）

参考となるHP等

新井研究室HP：<http://www-arailab.sys.es.osaka-u.ac.jp/>

田谷研究室HP：<http://www.cheng.es.osaka-u.ac.jp/tayalabo/home.html>