

# 平成 27 年度 未来研究ラボシステム 研究成果報告書

研究種目：共同研究

研究期間：平成 27 年 4 月～平成 28 年 2 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 3 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 5mm 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。

## ロボットアームを用いた組織体積層技術の開発

前年度において、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それらを配置するシステム開発の検討を行った。また、スフェロイドを想定した直径 97 $\mu\text{m}$  のマイクロビーズの把持・操作・リリースに成功した。これらの結果から、細胞のみから構成される組織体を自動構築する技術の目途が立った。しかし、厚い組織体の場合、内部への培養液の流通を想定した血管様構造が必要となる。そこで、平成 27 年度は、ロボットアームを用いた血管様構造の任意パターンニングに関する研究を行った。

本項目で使用したシステムの概観を図 1(A)に示す。シリンジポンプ 2 台、3 自由度ロボットアーム、上記の機器を制御するためのコンピュータから構成される。ゲル材料となる溶液、またはゲル化に必要な溶液をそれぞれシリンジに充填し、シリンジに接続したチューブを通してガラス管ノズルから吐出する。ディッシュ内で目的に応じたハイドロゲルファイバを生成し、ノズルをロボットアームで移動させることによって任意形状の構造物を構築する。なお、吐出したファイバーを吐出場所に固定するため、ディッシュの底にはディッシュ底面より摩擦力の大きい紙を敷いている。図 1(B)に示すノズルをロボットアーム先端に取り付け、アルギン酸ゲルファイバーを用いた格子構造構築実験を行った。

2 種類のゲル材料を装置内に流し、層流状態となる流速で送液することによって溶液同士が混ざらず、層構造のゲルファイバーを作製することができる。本実験では濃度の異なる 2 つのアルギン酸溶液を用いて層流ファイバーを作製し、目標形状として格子形状を構築することにした。中心の層はガラス管先端径 110 $\mu\text{m}$ 、アルギン酸溶液の濃度 0.6wt%、送液速度 20 $\mu\text{l}/\text{m}$  とし、外側の層はガラス管先端径 220 $\mu\text{m}$ 、アルギン酸溶液の濃度 1.0wt%、送液速度 50 $\mu\text{l}/\text{m}$  とした。

間隔  $500\mu\text{m}$  の格子構造を構築した実験結果を図 2(A)、この実験で作製した層流ファイバーを図 2(B)に示す。層流ファイバーの中心の層のファイバー径は  $130\mu\text{m}$ 、外側の層のファイバー径は  $160\mu\text{m}$  であった。この図から、層流ファイバーを用いた場合でも間隔を制御して格子構造を構築でき、層流状態を維持したままゲル化していることが確認できる。また、層流装置を 2 つ直列に連結させ、3 層の層流ファイバー作製実験を行い、3 層構造であっても作製可能であることを確認している。この技術により血管様構造を作製しながら任意の形状に配置することが可能となった。前年度の成果と組み合わせることで、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  $5\text{mm}$  以上の組織体を自動構築することが技術的に可能であることが証明できた。

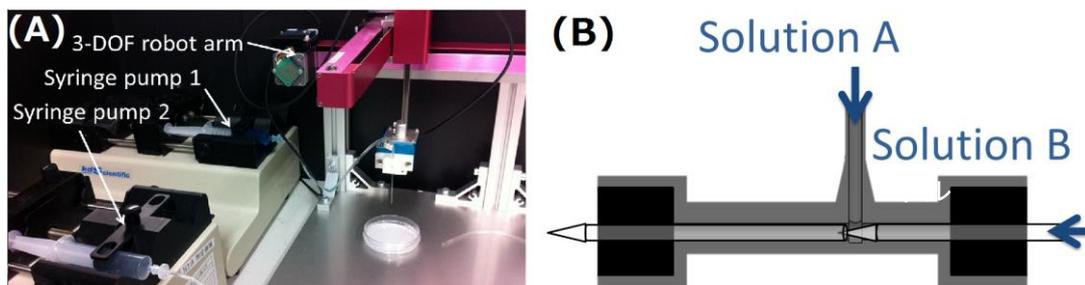


図 1 実験システム概要 (A) ロボットアームシステム. (B)層流ファイバー製作用ノズル概要図.

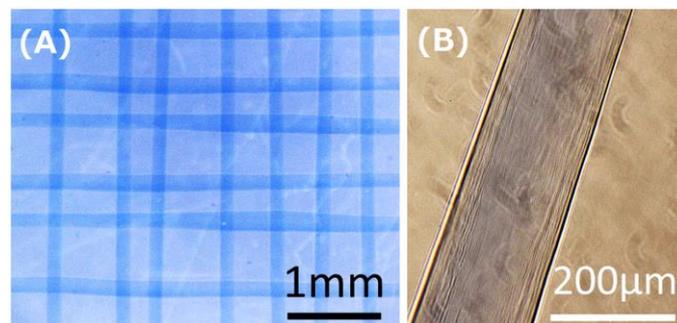


図 2 格子構造作製結果 (A) ロボットアームシステムによる任意形状パターンニング作製結果. (B)作製した層流ファイバーの拡大写真, 直径  $130\mu\text{m}$  の内部層と直径  $160\mu\text{m}$  の外部層からの 2 層構造.

### 3 次元的に配列された組織体の評価

前年度の検討で、セルロース製の中空糸に適切な修飾を施すことにより、血管内皮細胞がその上で増殖可能となるとともに動物細胞の生存に影響を与えずに、ファイバー素材をセルラーゼによって分解できることを明らかにした。平成 27 年度は、ファイバーの周囲に様々な細胞を任意の位置に配置するための技術の開発を試みた。具体的には、細胞を任意の位置に配置することを可能とする方法であるインクジェット式 3D プリンタを用い、細胞を含んだヒドロゲル構造体を作製する技術の開発を目指した。特に、細胞はその種類により、機能発現に必要な細胞周囲環境が異なることを考慮して、さまざまなインク材料を吐出できる方法の開発を行った。西洋わさびペルオキシダーゼの酵素反応で架橋するシステムを利用することで、アルギン酸やゼラチン、ヒアルロン酸などさまざまなインク材料から任意の位置にゲルを配置した立体構造を作製することが可能となった (図 3)。また、そのゲルには生存率 90% 以上で動物細胞を包括可能であった。さらに、前年度に実施したセルロース中空糸に関する検討と組み合わせ、セルロース中空糸を含んだ立体ゲルを作製することにも成功した (図 4)。

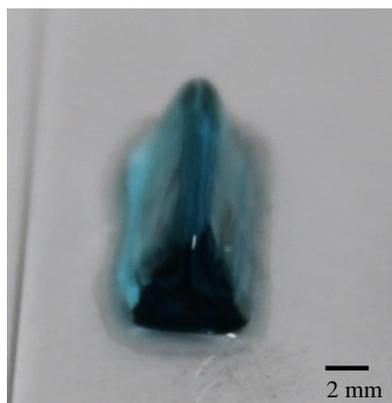


図 3. インクジェットプリンティングにより作製したゲル構造体.

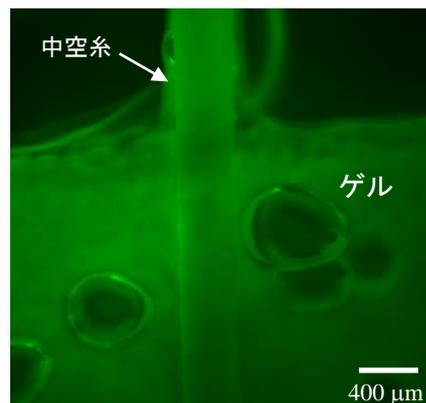


図 4. 中空糸とその周囲にインクジェットプリンティングにより作製したゲル.

上記と平行して、血管様の培養液を流動可能な流路を有する組織体の構築を目指した検討を実施した。血管内皮細胞で覆ったゲルファイバーと、同じく血管内皮細胞で覆った HepG2 細胞を内包したカプセルを集積した後に、ゲルの部分を細胞の生存に影響を与えない酵素を用いて分解することで、自発的に血管内皮細胞が形成した流路を介して、培養液を組織体の細部にまで送達することができる組織体の作製に成功した (図 5)。

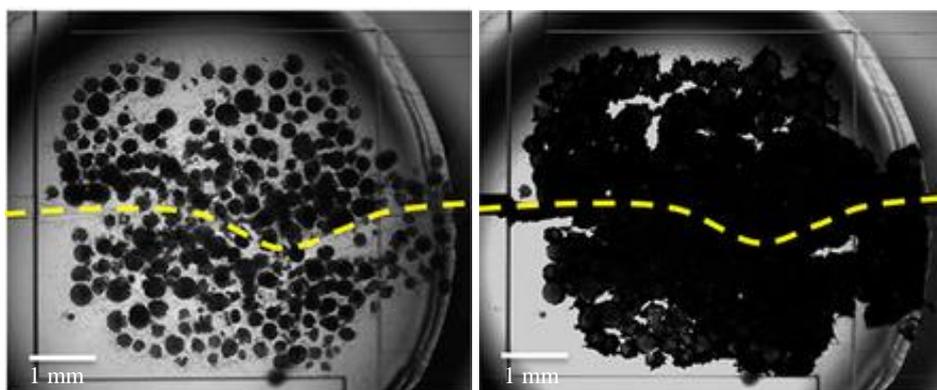


図 5. トレーサー粒子(直径 2 μm)含有培地流通前(左図)後(右図)の作製した 3 次元構造体.

### 3 次元的に配列された組織体の力学的評価

前年度の力学的計測に引き続き、球状組織体を 3 次元的に配置した場合の力学的特性の解析を行い、様々な配置環境下での力学的特性等を計測した。また、様々なスケールに対応させるべく、マルチスケールに対応可能かどうかを合わせて検討した。まず前者の配置特性評価として、光硬化性ゲルを用いた硬さ評価を行った。照射箇所と、照射箇所からの距離依存に対するゲル硬さの計測を行った。結果として、照射箇所からの距離依存に対するゲル硬さの時間依存性の計測に成功した (図 6)。また、マルチスケールへの対応として、直径約 20μm の細胞と、細胞から取り出した直径約 5-6μm の細胞核の硬さ計測を行った。結果として細胞核のようなよりサイズの小さいものでも計測が可能であり、また細胞核のほうが硬いことがわかった (図 7)。本成果により、配置環境やスケールにとらわれない硬さ計測への対応が可能となった。

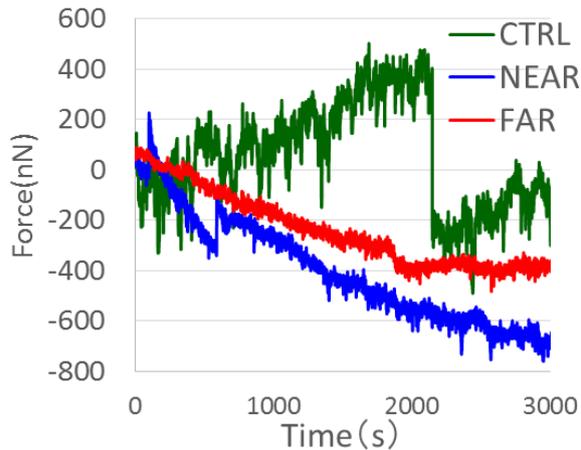


図 6. 光硬化性ゲルの硬さ計測結果, 対象物の配置環境への対応が可能.

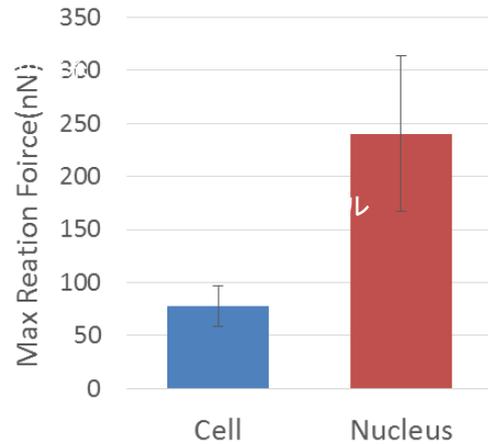


図 7. マルチスケールへの対応. 径約  $20\mu\text{m}$  の細胞と, 細胞から取り出した径約  $5\text{-}6\mu\text{m}$  の細胞核まで幅広いスケールレンジへの対応が可能.

**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 (H27 年度) の内訳**

備品費	消耗品費	旅費	謝金	その他	合計
0 円	706, 512 円	155, 740 円	0 円	117, 748 円	980, 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))

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 2 年

高田 賢 ・ システム創成/システム科学 大学院 1 年

中台 草太 ・ システム科学科/知能システム学 学部 4 年

田中 泰誠 ・ システム科学科/知能システム学 学部 4 年

木原 楽士 ・ システム科学科/知能システム学 学部 4 年

**発表論文等 (平成 28 年 3 月 31 日現在)**

[雑誌論文]

1. **M Horade**, M Kojima, K Kamiyama, T Kurata, Y Mae, T Arai: Development of an optimum end-effector with a nano-scale uneven surface for non-adhesion cell manipulation using a micro-manipulator, Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol. 25, 11, 2015.

2. **Shinji Sakai**, Kazuya Inamoto, Tomoaki Ashida, Ryo Takamura, Masahito Taya: Cancer stem cell

marker-expressing cell-rich spheroid fabrication from PANC-1 cells using alginate microcapsules with spherical cavities templated by gelatin microparticles, *Biotechnology Progress*, Vol.31, pp.1071-1076, 2015.

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*, vol.48, No.7, p.588-591, 2015.

4. **Shinji Sakai**, Yang Liu, Mikako Sengoku and Masahito Taya: Cell-selective encapsulation in hydrogel sheaths via biospecific identification and biochemical cross-linking, *Biomaterials*, vol.53, p.494-501, 2015.

5. **Shinji Sakai**, Kohei Ueda, Masahito Taya: Peritoneal adhesion prevention by a biodegradable hyaluronic acid-based hydrogel formed in situ through a cascade enzyme reaction initiated by contact with body fluid on tissue surfaces, *Acta Biomaterialia* vol.24, pp.152-158 (2015).

6. Mehdi Khanmohammadi, **Shinji Sakai**, Tomoaki Ashida, Masahito Taya; Production of hyaluronic acid-based cell-enclosing microparticles and microcapsules via enzymatic reaction using a microfluidic system, *Journal of Applied Polymer Science*, vol.133, 43107(8pages), 2016.

7. Yang Liu, **Shinji Sakai**, Masahito Taya; Engineering tissues with a perfusable vessel-like network using endothelialized alginate hydrogel fiber and spheroid-enclosing microcapsules, *Heliyon*, vol.2, e00067, 2016.

8. Kazuhisa Tomita, **Shinji Sakai**, Mehdi Khanmohammadi, Takayuki Yamochi, Shu Hashimoto, Masayuki Anzai, Yoshiharu Morimoto, Masahito Taya, Yoshihiko Hosoi; Cryopreservation of a small number of human sperm using enzymatically fabricated, hollow hyaluronan microcapsules, *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, in press.

[著書]

[学会発表]

1. 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組織構築システム. ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 2015.5, 1P1-O06 (2015).

2. **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. ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 2015.5, 1P1-N07 (2015).

3. 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構築手法の提案. ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 2015.5, 1P1-N09 (2015).

4. 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. ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 2015.5, 1P1-N06 (2015).

5. 洞出 光洋, 蔵田 智之, 小嶋 勝, 神山 和人, 前 泰志, 新井 健生, 表面ナノ凹凸加工付エンドエフェクタを利用した把持対象物のリリース性能の評価. ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 2015.5, 1P1-N10 (2015).
6. Mitsuhiro Horade, Tomoyuki Kurata, Masaru Kojima, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae and Tatsuo Arai, Development of Gripper On-board Micro-Heater and Force Sensor for High-accuracy Micro-manipulation. The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2015), Gyeongju, Korea, 2015.10, 416-418 (2015).
7. Mitsuhiro Horade, Tomoyuki Kurata, Masaru Kojima, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae and Tatsuo Arai, Study on Cell Manipulation Method with High-accuracy Three-dimensional Positioning Using a Manipulator. The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2015), Gyeongju, Korea, 2015.10, 1268-1270 (2015).
8. Mitsuhiro Horade, Masaru Kojima, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae and Tatsuo Arai, Development of Novel Micro Fluidic System without Channels and Wells for Trapping-and-releasing of Micro-objects. The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2015), Gyeongju, Korea, 2015.10, 1484-1486 (2015).
9. Suguru Takata, Masaru Kojima, Mitsuhiro Horade, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae and Tatsuo Arai, 3D Micro-structure Assembling Method by Micro-heater Array Device. The 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2015), Gyeongju, Korea, 2015.10, 1290-1292 (2015).
10. 洞出 光洋, 小嶋 勝, 神山 和人, 蔵田 智之, 前 泰志, 新井 健生, 表面凹凸処理により接触面積を低減した細胞付着防止マニピュレータ. 第 33 回日本ロボット学会学術講演会, 2015.9, 2F1-04 (2015).
11. 洞出 光洋, 小嶋 勝, 神山 和人, 高田 賢, 中台 草太, 蔵田 智之, 前 泰志, 新井 健生, マイクロヒータを用いた平面/空間任意箇所における局所熱刺激システムの開発. マイクロマシン・センサシステム研究会, 2015.9, MSS-15-041 (2015).
12. 中台 草太, 小嶋 勝, 洞出 光洋, 神山 和人, 前 泰志, 新井 健生, 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制御. 第 16 回システムインテグレーション部門講演会, 2015.12, 1I2-1 (2015).
13. 木原 楽士, 小嶋 勝, 洞出 光洋, 神山 和人, 境 慎司, 前 泰志, 新井 健生, その場灌流培養が可能な多層管状構造の構築用デバイスの開発. ロボティクス・メカトロニクス講演会 2016, (2016. 採択決定済) .

[その他]

#### 招待講演

1. 洞出 光洋 (公社)日本分析化学会近畿支部主催 異分野融合による新規分離分析法の創成のための若手講演会, 「微細加工技術を基盤とした生化学分析・細胞操作用デバイスの開発」, 2015.11.7, 大阪大学基礎工学研究科・豊中キャンパス.
2. Shinji Sakai, Application of enzymatic reactions for hydrogel-based biomedical engineering; Warsaw University of Technology, Chemical and Process Engineering Faculty Seminar, 2015年6月16日 (Warsaw University of Technology, Warsaw, Poland).

#### 特許出願

1. 洞出 光洋, 小嶋勝, 神山和人, 前泰志, 新井健生, 表面ナノ凹凸構造を有するマイクロマニピュレーション用エンドエフェクタ, 及び表面ナノ凹凸構造の製造方法, 日本, 特願2015-081466 (出願), 2015.4.

外部資金獲得状況・申請状況 (本研究課題に関連して、科研費、JST 等の競争的資金、受託研究、奨学寄付金等を受給された場合、また、申請された場合はその状況を記入ください)

科研費 基盤(B) 2015年4月1日～2018年3月31日, 酵素反応で定着・除去可能なゲルを形成するバイオプリンタ用インクライブラリの開発, 代表 境慎司

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>