

令和元年6月21日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11918

研究課題名(和文) 単一細胞分化への重力影響の解明を目指したマイクロ型擬似無重力発生システムの開発

研究課題名(英文) Micro gravity generation system for observation of behavior and differentiation of a single cell

研究代表者

亜力坤 亜夏爾 (Yalikun, Yaxiaer)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・准教授

研究者番号：30735064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は単一細胞の無重力環境の創成、細胞分化の様子を動的に観察ができる汎用顕微鏡に設置可能なマイクロ擬似無重力生成システムの開発した。まず、流体のみを用いた、多様な細胞に対応可能な非侵襲なマイクロ流体回転デバイスおよびシステムの開発に成功した。さらに、開放的なシステムでありながら、酸素の供給、培養液の交換できる、生物学分化領域で一番よく使われているES、iPS細胞にも使用できるマイクロ流体回転デバイスの開発に成功した。最後に、汎用顕微鏡などに設置が可能で、生きた単一細胞の構造形態を、生理機能を乱さずに、リアルタイムに観察できるデバイスとして高く評価され、企業と一緒に特許を取得した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は単一細胞(受精卵)の無重力環境の創成、細胞への刺激またはその分化の様子を動的に観察ができる汎用顕微鏡に設置可能なマイクロ擬似無重力生成システムの開発を行い、論文など研究成果だけではなく、企業と一緒に実用化を目指した特許も取得した。

本研究により単一細胞が分化する際の、莫大な関連情報を同時に収集することが可能になった。特に、単一細胞の擬似無重力状態(回転状態)での分化をリアルタイムで観察する研究は既存システムの制限により困難だったが、本研究で開発したデバイスは無重力環境での単一細胞分化に関する研究領域へ踏み込むための有力なツールになり、生物学的な新発見につながるなどの重大な意義を示した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed a rotational micro-gravity generation system that enables creation of a single-cell micro-gravity environment and dynamic observation of cell differentiation. In this research, first, we succeeded in developing a noninvasive microfluidic rotation device and system that can handle various cells using only fluid in micro scale. The structural forming of living single cells can be observed in real time without disturbing physiological functions. In addition, it also fully compatible with a general-purpose microscope and has potential to be widely used in biological field. We also successfully improved it to an open system that can be used for ES and iPS cells and also can supply oxygen and exchange culture media, which are the most commonly used sample in biological differentiation areas. Finally, we have applied a patent with a big company due to the potential market scale.

研究分野：bio-MEMS, Microfluidic, micro gravity

キーワード：微小製造 微小回転 受精卵 分化 宇宙

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

近年、世界規模の爆発的な人口の増加に伴う地球での資源、空間及び環境が圧迫されている。新たに人類が繁栄する場所やそれに必要な資源を探索する必要がある。このような背景の中、宇宙開発が急激に進み、将来宇宙での大規模な宇宙ステーションあるいは惑星基地などの建設が現実的な話になって来た。しかし、そういった宇宙開発においては生体（人類、食糧の植物、他の動物）が恒常的に微小重力環境に長時間滞在する必要がある。そして、苛酷な宇宙環境における微小重力環境のもとで生体が生存と繁殖していくことが不可欠である。特に、重力環境の変化は動物の生殖へ著しく影響を与えると考えられている。

これまで、宇宙空間での受精や発生など生殖に関する研究は、植物、魚類や両生類で行われており、微小重力はそれらの生体の繁殖に影響がないことが確認された一方、哺乳類の受精や初期発生についての研究は哺乳類が環境の変化に敏感で、自主受精卵が影響されやすいため、まだ成功していない。また、哺乳類の受精や初期胚の発生に関する実験を宇宙で行うことは、経済的に負担が極めて高い上に、確実に実験が成功する保証がない。したがって、現在の宇宙開発の技術で哺乳類の受精や初期発生に関する研究はほぼ不可能な状況となっている。この問題を解決するために無重力状態における生物の成長に関する試験を地上で行うことが可能な擬似無重力状態生成装置の開発が欠かせない。従来、擬似無重力生成を目的とした装置は複数の原理で開発された。たとえば、強い磁場、大規模の回転流体、または3次元回転を利用した方法がある。特に最近、弓削らが3次元回転を利用した3D-クリノスタット方式のものを利用して、胚発生や出産率が約半分に低下したことから重力の必要性を証明し、哺乳類が宇宙環境において正常に繁殖するのは困難である可能性を初めて示した。

しかし、従来のデバイスは培養液にある複数または集団の細胞を対象とした培養容器ごとでの擬似無重力生成システムである。また、培養容器を3次元回転にさせることによって生じる不安定な微小水流環境の影響、複数細胞同士の互いの影響、または細胞密度の影響は無視できない。さらに、これらのデバイスは複雑な専門大型設備であり、試料を擬似無重力装置から母体に移植する場所までの運送、処理などに非常に時間がかかっている。この間も1Gの重力環境下におかれるため、胚の修復が行われ、産仔率を上げていた可能性があり、擬似無重力試験の信憑性に影響が出ている。確実に単一細胞が3次元回転し、擬似無重力状態にするシステムはまだ存在しない。

2. 研究の目的

ここで、上記の課題を解決するため、本研究は単一細胞の無重力環境の創成、細胞分化の様子を動的に観察ができる汎用顕微鏡に設置可能なマイクロ擬似無重力生成システムの開発を目指している。本研究の原理は図1(a)のように中心部に微小孔が加工してあるマイクロチップを製造し、微小孔から開放水中空間で噴水し、マイクロスケールの旋回水流を生じさせる。この微小旋回水流を用い、非侵襲で、機能中の生きた単一細胞を、生理機能を乱さずに、3次元的に回転させることができる。原理検証段階における卵細胞の三次元的に回転している様子を図1(b) (c)に示している。このような回転で、卵細胞が重力による刺激を受ける前に、卵細胞にかかる重力の方向が変化し、重力ベクトルが分散されることで、働く重力の時間平均が実質的にゼロになり、擬似的な無重力状態を生成する。

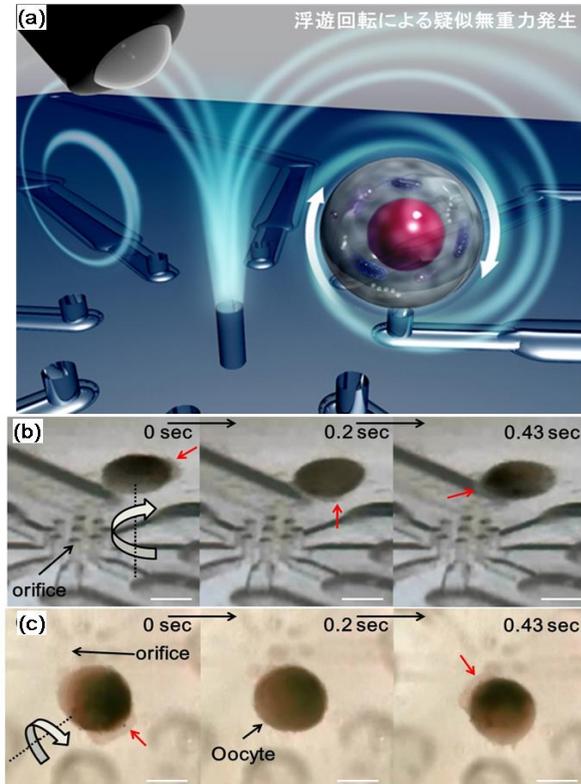


図1.単一細胞の浮遊回転による擬似無重力状態。(a)卵細胞の浮遊回転のイメージ図。(b)卵細胞の浮遊回転の側面実験写真。(c)卵細胞の浮遊回転の上部実験写真。

3. 研究の方法

●課題：旋回流の特性への微小孔の形状、寸法、または流体が触れる表面材料の粗さ、材質、物性により影響を定量化する。現段階のシステムは原理検証のための簡易なシステムであり、短時間回転することを実現しているが、旋回流の特性に最適な水流の精密制御はまだ実現していないため、求められた回転速度で細胞を長時間安定に回転することはできない状況である。

ここで、開放空間でのマイクロ流体の3次元特性を十分に解明する必要があり、旋回流の特性を調べる。より理論的にマイクロ旋回流の本質を理解するため、気-液2層流モデルを設立し、シミュレーションソフトウェアを利用して、細胞を回転する際に操作対象の周囲に起きたマイクロ旋回流を図2のように再現する。図2に示しているのは直径400 μm の卵細胞を回転させる流量22 $\mu\text{L}/\text{min}$ での旋回流のパターンである。このように開放空間におけるマイクロスケールの流体挙動をシミュレーションで分析し、微小孔の形状、寸法とマイクロチップ関連のパラメータにより、変化した旋回流のパターンの特徴、作用力と操作対象の物性関係などを理論上で求める。これらの結果に基づき、本システムに使用するマイクロチップの微小孔の形状などの最適設計、及びマイクロチップの材質などが選定できるようになる。

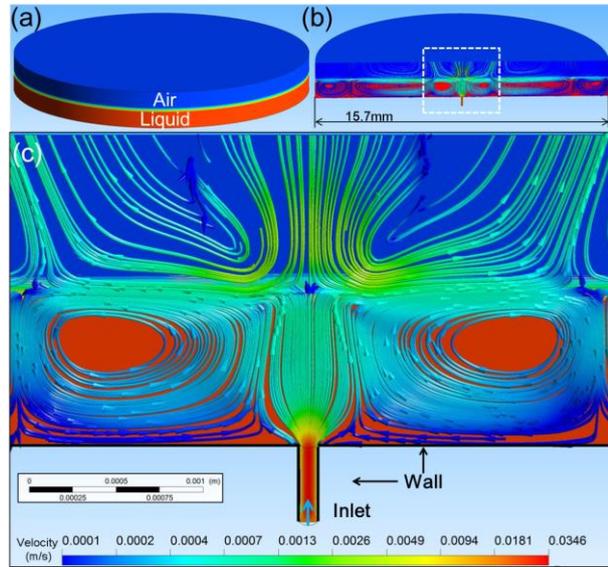


図2.流体シミュレーションでマイクロ旋回流解析 (a)気-液2相流モデルの全域。(b)シミュレーション結果の断面積。(c)シミュレーション結果の断面積の中心部拡大図。

●課題：単一細胞の安定した3次元回転を実現するための微小孔の精密化

細胞の擬似無重力回転動作を再現性の高い、安定した回転にするため、シミュレーションで計算した値をマイクロチップの設計に反映し、マイクロチップにMEMS技術を用いて、微小孔をナノ精度で作製する。これまでの旋回流生成用マイクロチップ上の微小孔は機械加工で作製したが、形状や寸法加工には限界があり、数ミクロンから数百ミクロン単位の直径の細胞を安定して回転するためにより精密な流れを提供できる微小孔の加工が必要である。そのため、加工方法としては精度・再現性の高い加工手法が望ましい。ここで我々はMEMS (Micro Electro Mechanical System) に注目した。この手法で、再現性が保証された上でナノ構造体まで精密に大量生産できる。また、より複雑な3次元構造体を作成するため、高価格なSOI (Silicon on Insulator) ウェハを利用した新たな2層構造を持つ操作チップを作製する。図3のように、設計予備案として、この操作チップはLAYER1 (SOI ウェハ) とLAYER2 (SI ウェハ) で構成される。各層の両面に加工しており、最後に2枚ウェハを熱融合で接合する。この方法で、マイクロチップの中心領域に直径5-50 μm の穴数個を設けることが可能となり、直径10-100 μm の生体試料を回転させることが可能である。

●課題：単一細胞の安定した3次元回転を実現するための精密流量制御

本システムの評価機能を実現するため、下記の手順で構築する予定である。図4のように、観察用顕微鏡 CCD カメラを操作チップの上に配置し、パソコンでリアルタイムに観測しながら、マイクロチップに接続されているシリンジポン

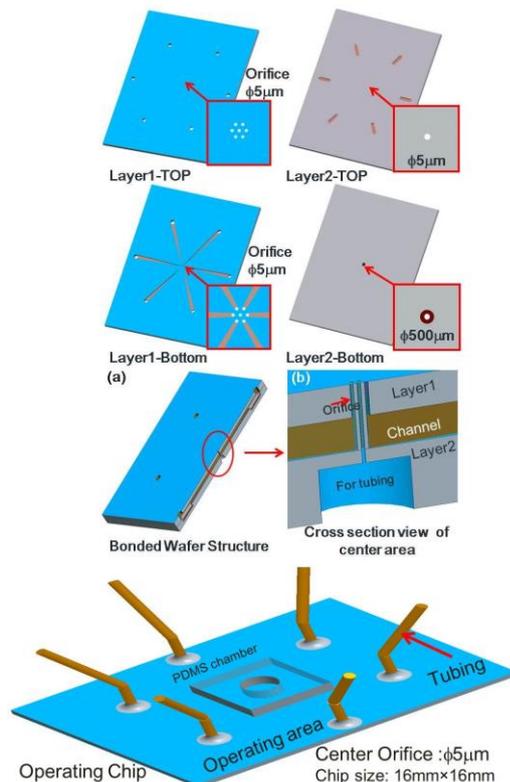


図3. マイクロ流体デバイス

プで、水を送り、チップ表面の中心部で旋回流を生じさせ、生体試料の回転を行う。ポンプはコントローラユニットを経由してPCから精密に制御できるようにする予定がある。さらに、これまでのシミュレーション結果と画像認識技術に基づき、回転対象の回転速度、場所、形態変化など情報を利用し、微小水流の高精度制御に適した独自の pL 精度レベルでの流量制御アルゴリズムを開発する。

●課題:哺乳類の受精卵を対象とした評価試験実施の試み

本研究では独創的な擬似無重力システムが使用されるため、従来の実験方法や手順は通用しない部分がある。微小重力を発生させるために、特殊な実験器具、培養条件、及び受精卵条件などが必要となるが、本研究ではこの段階での実施目的を、受精卵および初期胚の発生への重力の影響調査に絞る。この前提のもと、本システムにおける哺乳類の受精卵の発生過程をモニタリングする方法を確立する。さらに、噴水流速によって旋回流回転速度が成業されるため、 μ G-1G まで様々な重力環境の創生は可能であるため、多様な条件での卵細胞の発生への影響を調べる。より一層正確で、信頼性の高い発生の評価試験を行うため、1年間にわたり複数回を行う予定である。

4. 研究成果

●課題:旋回流の特性への微小孔の形状、寸法、または流体が触れる表面材料の粗さ、材質、物性により影響を定量化する。

研究期間において、上記の課題の解決を目指し、電気、磁場、レーザー、AFM、物理接触などを使用せずに、マイクロスケールの流体のみを用いた、多様な細胞（動物、魚類、両生類）に対応が可能な非侵襲なマイクロ流体回転デバイスおよびシステムの開発に成功した[業績論文 4]。また、汎用顕微鏡などに設置が可能で、生きた単一細胞の構造形態を、生理機能を乱さずに、リアルタイムに観察できるデバイスを開発し、**企業と一緒に特許を取得した[特許 1]**。さらに、開放的なシステム（完全に閉じてないデバイス）でありながら、酸素の供給、培養液の交換できる、生物学分化領域で一番よく使われている ES、iPS 細胞にも使用できるマイクロ流体回転デバイスの開発に成功した[業績論文 3]。

●課題:単一細胞の安定した3次元回転を実現するための微小孔の精密化

高精度の画像採集に向けて単一細胞の安定した3次元回転を実現する必要がある、シミュレーションを用いて分析したところ、微小孔の精密化で受精卵のより安定した回転を実現ができると証明した。これを実証するため既存の回転システムに用いられた $100\mu\text{m}$ 直径の穴を新しい加工手法でより小さい穴 ($40\mu\text{m}$) の作製に成功し、これを用いて従来の受精卵回転軸ずれを $1/5$ まで低減することに成功し、受精卵の全表面リアルタイム画像採集の実施に成功した[業績論文 1]、さらにこの穴加工技術を利用して、EB 細胞の培養デバイスまで開発した[業績論文 2]。

●課題:単一細胞の安定した3次元回転を実現するための精密流量制御

より精度高く安定回転を実現するため、これまでのシミュレーション結果と画像認識技術に基づき、回転対象の回転速度、場所、形態変化など情報を利用し、微小水流の高精度制御に適した独自の pL 精度レベルでの流量制御アルゴリズムとポンプシステムを開発した。そのポンプシステムを使用することで、細胞の回転だけではなく、細胞の物理密度の測定まで可能にした[国際学会論文 3]。

●課題:哺乳類の受精卵を対象とした評価試験実施の試み

これにより、地上における手のひらサイズのデバイスで、単一細胞（受精卵）レベルでの精密回転デバイスの開発には成功し、複数の国際学会から受賞した[国際学会論文 2 と 3]。特に哺乳類の受精卵を回転するところで一定の影響がみられたが、より繊細な調査と多くの実験が必要であり、哺乳類の細胞分化への回転及び重力の影響を引き続き調査し、学術論文にまとめる予定がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 4 件）

- (1) **Y. Yalikul**, Y. Aishan, A. Mosha, K. Sumiyama, **Y. Tanaka**, “Oocyte all-surfaces' imaging method using micro-scale rotational flow,” *Micro & Nano Letters*, 13(3), 306-311 (2018,3), 査読付き
DOI: 10.1049/mnl.2017.0731
- (2) **Y. Yalikul**, Y. Hosokawa, T. Iino, **Y. Tanaka**, “Embryonic body culturing in an all-glass microfluidic device with laser-processed 4 μm thick ultra-thin glass sheet filter,” *Biomedical Microdevices*, 19, 85 (2017,10), 査読付き
DOI: 10.1007/s10544-017-0227-7
- (3) **Y. Yalikul**, Y. Kanda, **K. Morishima**, “A Method of Three-Dimensional Micro-Rotational Flow Generation for Biological Applications,” *Micromachines*, 7(8), 140, (2016.7), 査読付き
DOI: 10.3390/mi7080140
- (4) **Y. Yalikul**, Y. Kanda, **K. Morishima**, “Hydrodynamic Vertical Rotation Method for a Single Cell in an Open Space,” *Microfluidics and Nanofluidics*, 20(5), 1-10. (2016.4), 査読付き
DOI: 10.1007/s10404-016-1737-y

〔学会発表〕（計 7 件）

国際学会発表

- (1) Yusufu Aishan, **Yaxiaer Yalikul**, **Yo Tanaka**, “4-step micro glass blowing method for all glass lens array fabrication,” The 22nd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2018) (Kaosiung, Taiwan, Nov. 2018), 査読付き.
- (2) **Yaxiaer Yalikul**, Yusufu Aishan, Kenta Sumiyama, **Yo Tanaka**, “Imaging Method of Oocyte by using a Micro-scale Rotational Flow”, 28th 2017 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (From Micro & Nano Scale Systems to Robotics & Mechatronics Systems) (Nagoya, Japan, Dec. 2017), 査読付き, [国際学会受賞論文](#).
- (3) **Yaxiaer Yalikul**, **Yo Tanaka**, “A Convenient and Rapid Density Measurement of Single Cell,” *Proceeding of the RSC Tokyo International Conference 2016* (Chiba, Japan, Sep. 2016), 査読付, [国際学会受賞論文](#).
- (4) **Y. Yalikul**, T. Hoshino, **K. Morishima**, “Micro Vortex Flow Induced Rotation Method of Single Cell in Open Space,” *Proceedings of the 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2015)*. pp.713-715 (2015.11), 査読付き.

国内学会発表

- (1) **亜力坤亜夏爾**, “微小水流を用いた希少細胞の観測、操作システムの開発”, [イノベーション・ジャパン 2015](#), 京都, JP-53B1, (2015. 8).
- (2) **亜力坤亜夏爾**, **森島圭祐**, “オンチップ三次元細胞のイメージング法の検討”, [日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015\(ROBOMECH2015\)](#), 京都, 1P1-L04, (2015. 5).
- (3) **Yaxiaer Yalikul**, 諫田泰成, **森島圭祐**: 微小旋回水流を用いた細胞の 3 次元回転操作方法に関する研究、第 14 回日本再生医療学会、横浜 (2015. 3).

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：細胞回転方法、細胞観察方法、細胞回転装置、及び細胞観察装置
発明者：井上 和夫、山本 正樹、森島 圭祐、ヤリクン ヤシャイラ
権利者：パナソニック IP マネジメント株式会社(大阪府)
種類：特許
番号：特開 2018-74966
出願年：2016
国内外の別： 国内

[その他]

ホームページ：

<https://researchmap.jp/yaxiaer/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：森島 圭祐

ローマ字氏名：Morishima, Keisuke

所属研究機関名：大阪大学

部局名：工学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：60359114

研究分担者氏名：田中 陽

ローマ字氏名：Tanaka, Yo

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：生命機能科学研究センター

職名：チームリーダー

研究者番号（8桁）：40532271

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。