

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13910

研究課題名(和文) 生体組織アレイを再構築する3次元光造形シングルセルスポットの開発

研究課題名(英文) Photopolymerization-based 3D Single Cell Spotter for Reconstruction of Tissue Array

研究代表者

永井 萌土 (nagai, Moeto)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：00580557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、生体組織アレイを再構築する3次元光造形シングルセルスポットを開発することであった。高い効率で細胞のプリンティングを実現することを目指した。セルスポットにおける主要な構造を形成することに成功した。すなわちSU-8の縦穴とPDMSの空圧膜からなる可変開口が構築された。また単一細胞のみが流れてトラップされるように流路を設計した。2段のSU-8とPDMS流路を組み立てることで構造を構築した。今回の基礎作成技術は、基板上に単一細胞をパターンニングすることを可能にする。さらに細胞液滴を形成するために、光硬化性樹脂の液滴をマイクロ流路で形成して、その特性を評価した。

研究成果の概要(英文)：Our objective is to assemble a 3D tissue with a single cell spotter. This study aims to achieve high throughput single cell printing. We made the essential part of a cell spotter. Adjustable openings were composed of SU-8 vertical openings and PDMS pneumatic valves. We fabricated a nozzle structure and designed flow channels to trap single cells on the openings by calculating flow ratio through microchannels. The structure was assembled from a two-step SU-8 structure and PDMS channel. These fundamental fabrication technologies enable the patterning of single cells on a substrate. Photocurable resin droplets were generated in a microchannel and its properties were characterized.

研究分野：バイオマイクロシステム

キーワード：細胞3Dプリンタ 単一細胞 ノズルアレイ 微小液滴生成 多点光照射 光硬化性樹脂

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する最小の機能素子である細胞の機能理解は、この上位階層である組織、器官の働きを解き明かして、医学・薬学を進展させる。多細胞生物の組織は、何種類かの決まった細胞が一定のパターンで集合した3次元構造を持つ。同じ形態を持つ細胞でも周囲細胞との相互作用で変化し、種々の機能が影響を受ける。

このため生体外にて組織の構造を正確に再現し、細胞機能を調べることが細胞機能を解明する鍵となる。ここで3次元生体組織を単一細胞レベルで再構築するためには、単一細胞を緻密に3次元的に組み上げる技術とシステムが必要となる。

2. 研究の目的

生体外の3次元生体組織(生体システム)アレイの再構築を目的として、生分解性・光硬化性モノマーで被覆した単一細胞(直径約10 μm)を利用し、3次元光造形を行う単一細胞プリンタの開発(Fig. 1)を進めた。本研究で実績のある細胞操作・加工技術に加え、流体力・圧力・光を駆使し、複数種の単一細胞を3次元的に組み上げる光造形システムの構築を目指した。

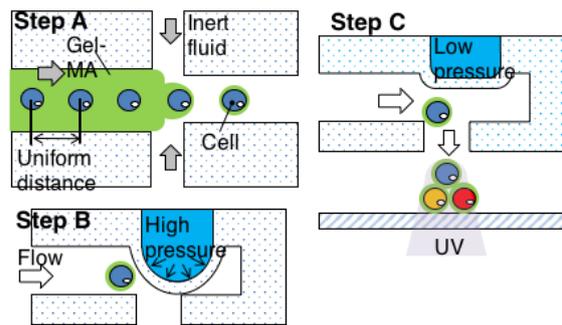


Fig. 1 Working principle of massively parallel single cell printer. Step A: Single cells are ordered and encapsulated. Step B: The coated single cells are trapped on an adjustable opening. Step C: The ejected cells are immobilized after the exposure of UV light.

3. 研究の方法

3. 1. 光硬化性樹脂液滴の生成評価

細胞アセンブリの実現には、細胞を光硬化性樹脂で被覆すること、迅速に液滴を生成することが求められる。ここでは光硬化性樹脂液滴の生成を評価した。

液滴生成で使用する流体デバイスは、PDMSで作製する。まず、Si基板にフォトリソレジストSU-8をフォトリソグラフィによりパターンニングして、流路型を作る。PDMSを流し込み、流路型を転写する。ガラス基板にPDMSをスピコートしたものに、永久接合して流体デバイスを完成させる。

光硬化性樹脂にはPBS(リン酸緩衝生理食塩水)に希釈した5 w/v%のpoly(ethylene glycol) diacrylate (PEG-DA)を利用した。これを分散

相として使用した。連続相には、フッ素系不活性液体であるフロリナートFC-40(3M)を用いた。液滴生成の撮影には倒立顕微鏡(Eclipse Ti, Nikon)、高速カメラ(VW-600M(10,000 fps), Keyence)を使用した。連続相の流量は40 μL/minと固定し、分散相の流量条件を変更した。分散相の流量変化に対する液滴生成周波数および出口幅に対する液滴径の変化を評価した。

3. 2. ノズルアレイ構造作製技術の確立

ノズルアレイは、観察に適した透明材料であり、生体適合性をもつPDMSおよびSU-8を使用した。Fig.2(b)に示す流路断面図となるようにデバイスを形成する。デバイスは3層で構成され、1)空圧制御層、2)PDMSバルブ、3)細胞捕獲用流路層に分かれている。作製プロセスをFig.3に示す。

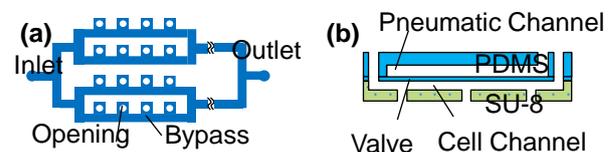


Fig. 2 Schematic of a channel for cell trapping. 4 x 4 openings are placed in the middle of the channel. (a) Top and (b) cross-sectional views.

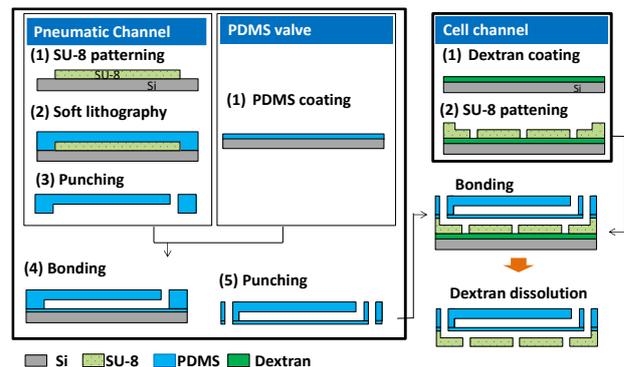


Fig. 3 Fabrication process of a nozzle array. First, pneumatic channel layer and PDMS valve layer are bonded. Second, the two layers are bonded with cell channel layer. Lastly, the structure is released by dissolving a dextran film.

犠牲層としてDextranをコーティングしたSi基板にSU-8をパターンニングする。続いてアミノ基で修飾したPDMSバルブとSU-8を接合する。N₂プラズマ処理でPDMSにアミノ基を修飾したあと、PDMSとSU-8を接合した。犠牲層であるDextranの溶解には50℃の水を用いた。ピンセットで剥離を促してSi基板からデバイスを分離した。

3. 3. 空圧印加実験

細胞捕獲時のPDMSバルブ操作は、空圧で行う。空圧印加で駆動し、また耐久性があるかを確認した。2000, 2500, 3000 rpmでスピコートしたPDMSバルブ(主剤と硬化剤

を 10:1 の重量比で混合) を有する各デバイスを用意した。190 kPa まで空圧印加を行った。実験には、コンプレッサと空圧制御装置を使用した。

4. 研究成果

4. 1. 光硬化性樹脂液滴の生成評価

分散相流量 $12 \mu\text{L}/\text{min}$ 、出口幅 $40 \mu\text{m}$ のときの液滴生成の顕微鏡像を Fig. 4 に示す。中央の流路から、光硬化性樹脂の液滴が生成される。それぞれの液滴生成の間隔は、 $0.85 \pm 0.05 \text{ ms}$ ($n=10$) であった。液滴生成が確認されたのは、分散相の流量が $2 \mu\text{L}/\text{min}$ から $14 \mu\text{L}/\text{min}$ の範囲であった。

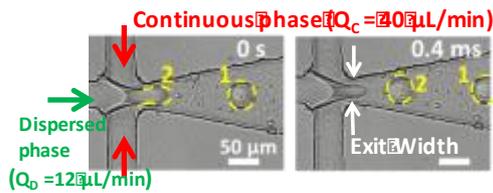


Fig. 4 Microscope images of the droplet generation of a photocurable gel solution. Exit width : $40 \mu\text{m}$

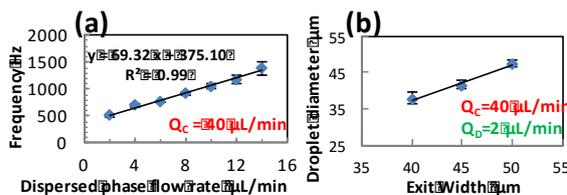


Fig. 5 Evaluation of droplet generation. (a) Generation frequency. (b) Droplet diameter.

分散相の流量と液滴生成周波数の関係を Fig. 5(a) に示す。分散相の流量増加に比例し、液滴生成周波数が増加した。最大は、分散相流量 $14 \mu\text{L}/\text{min}$ 時で $1381 \pm 134 \text{ Hz}$ ($n=10$) であった。また、Fig. 5(b) に分散相流量 $2 \mu\text{L}/\text{min}$ 時の出口幅と液滴径の関係を示す。出口幅が小さいほど液滴径は小さくなる傾向がある。出口幅 $40 \mu\text{m}$ の場合、 $37.9 \pm 1.54 \mu\text{m}$ ($n=5$) であった。

4. 2. ノズルアレイ構造作製技術の確立

作製した 10/10 パターンで基板からの分離に成功した。Fig. 6 左は、 N_2 プラズマによる接合方法で作製したデバイスを底部から倒立顕微鏡 (ECLIPSE Ti, Nikon) で観察した像である。SU-8 層と PDMS 層のアライメントのズレは $5 \mu\text{m}$ 以内に収まった。精度は動作に十分であった。流路型となる SU-8 モールドの観察から、空圧制御層の流路高さは $50.1 \pm 1.7 \mu\text{m}$ ($n=3$) であった。細胞捕獲用流路層の開口径は $39.0 \pm 1.4 \mu\text{m}$ ($n=16$) であった。

また、Fig. 7 に示すセットアップで、水中にて細胞捕獲用流路のインレットから空気を導入した。16/16 の開口から気泡が発生し、貫通

していることを確認した。

4. 3. 空圧印加実験

Fig. 8 は PDMS のスピコート回転数に対する膜厚を示す。これが、PDMS バルブの膜厚となる。膜厚 3 条件の各デバイスにおいて 190 kPa までの空圧印加を問題なく達成した。デバイスの損傷は見られなかった。

Fig. 6 は PDMS バルブ膜厚が $17.3 \mu\text{m}$ (3000 rpm) のデバイスである。空圧印加前後を比較した顕微鏡像である。PDMS 層である空圧流路が変形し、拡大している。30 秒間程度の印加に問題なく耐えた。

今回の場合では 180 kPa の空圧印加により最大 $20 \mu\text{m}$ の変形が起こる計算(3)となる。可変開口にて細胞捕獲が可能であると考えられる。今後は、空圧印加状態での細胞捕獲について評価を検討している。

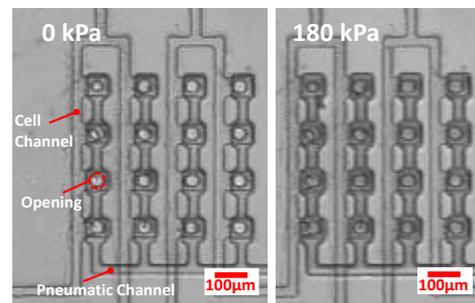


Fig. 6 Microscopic images of the device before and after the application of air pressure.

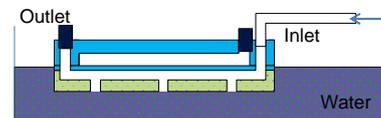


Fig. 7 Schematic evaluation setup of the openings of a nozzle array.

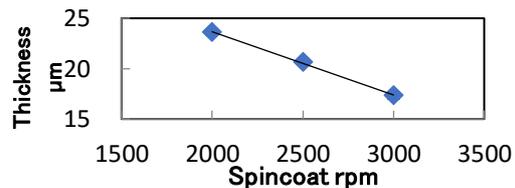


Fig. 8 PDMS film thickness versus spin coating rpm.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)
 Moeto Nagai*, Kei Kato, Takayuki Shibata, "Integration of microorganism Vorticella convallaria and poly (ethylene glycol) diacrylate hydrogel for biohybrid systems," Mechanical Engineering Letters, Vol. 2 (2016) p. 16-00445.

Moeto Nagai*, Kei Kato, Takayuki Shibata, "Underwater motion of hydrogel microstructure by optofluidic lithography studied with gap control

and object holding platform," Microelectronic Engineering, Vol. 164 (1), pp. 108-114, October (2016).

〔学会発表〕(計 9 件)

1. 平塚 翔太, 河原田 翔, 佐藤 省吾, 永井 萌土, 柴田 隆行「光硬化性ゲルへの多点光照射を利用した3次元並列細胞アセンブリ技術の構築」ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017, 2A1-G05, 3p, ビッグパレットふくしま, 福島県郡山市, 2017年5月10日(水)~13日(土).
2. 佐藤 省吾, 平塚 翔太, 河原田 翔, 永井 萌土, 柴田 隆行「3次元並列細胞アセンブリのための光硬化性マイクロ液滴操作技術の開発」ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017, 2A1-G06, 3p, ビッグパレットふくしま, 福島県郡山市, 2017年5月10日(水)~13日(土).
3. 平塚翔太, 河原田 翔, 佐藤省吾, 永井萌土, 柴田隆行「超並列単一細胞プリンタの開発 —多点光照射による細胞アセンブリ技術の構築—」精密工学会 2017年度春季大会, 慶應義塾大学矢上キャンパス 2017年3月13日(月)~15日(水).
4. 河原田 翔, 平塚翔太, 佐藤省吾, 永井萌土, 柴田隆行「超並列単一細胞プリンタの開発 —可変開口を用いた細胞アセンブリ技術の確立—」精密工学会 2017年度春季大会, 慶應義塾大学矢上キャンパス 2017年3月13日(月)~15日(水)
5. 平塚 翔太, 河原田 翔, 佐藤 省吾, 永井 萌土, 柴田 隆行「光造形 3D シングルセルスポットの開発(第 2 報)—細胞パターンニング用光学システムの構築—」, 精密工学会 2016 年度秋季大会, 茨城大学 水戸キャンパス, 2016 年 9 月 6 日~8 日.
6. Sho Kawaharada, Shota Hiratsuka, Shogo Sato, Moeto Nagai, and Takayuki Shibata, "Massively Parallel Single-Cell Printer – Evaluation of Droplet Generation and Fabrication of Nozzle Array–" The Irago Conference 2016, Auditorium, University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo, 1-2 November, 2016. Poster
7. Shota Hiratsuka, Sho Kawaharada, Shogo Sato, Moeto Nagai, and Takayuki Shibata, "Massively Parallel Single-Cell Printer –DMD-based Optical System for Single Cell Immobilization–" The Irago Conference 2016, Auditorium, University of Electro-Communications, Chofu, Tokyo, 1-2 November, 2016. Poster
8. ○平塚 翔太, 河原田 翔, 永井 萌土, 柴田 隆行(豊橋技術科学大学)「光硬化性ゲルを用いた低侵襲 3 次元細胞組織アセンブリ技術の開発」第 16 回計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会 (SI2015), pp. 694-696, 2015 年 12 月 14 日(月)~16 日(水), 名古屋国際会議場.

9. ○河原田翔, 永井萌土, 柴田隆行, 「3 次元細胞組織アセンブリのための可変開口を利用した単一細胞の捕獲・脱離技術の開発」, 2015 年度精密工学会秋季大会, pp. 781-782, 東北大学 川内北キャンパス, 2015 年 9 月 4 日~6 日.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 貫通孔と流路を一体化したマイクロ流体輸送構造体およびその製造方法

発明者: 永井萌土、柴田隆行、河原田翔

権利者: 国立大学法人豊橋技術科学大学

種類: 特許

番号: 特願 2017-026311

出願年月日: 2017 年 2 月 15 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://mems.me.tut.ac.jp/>

<https://sites.google.com/site/moeton/>

6. 研究組織

研究代表者

永井 萌土 (Nagai, Moeto)

豊橋技術科学大学 大学院工学研究科・講師

研究者番号: 00580557