

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02115

研究課題名(和文) 振動誘起流れを用いた細胞スフェロイドの大量生産・品質評価

研究課題名(英文) Mass production of cell spheroid based on a vibration-induced flow

研究代表者

早川 健 (Hayakawa, Takeshi)

中央大学・理工学部・准教授

研究者番号：70759266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「細胞スフェロイドの高効率作製法の実現」と、「作製されたスフェロイドの三次元形態情報による品質評価法の確立」の2つを目的として研究を行った。まず、（和文）に、振動誘起流れという現象を用いてマイクロ流体チップ上でスフェロイドを作製する技術を提案し、約十分で数百個のスフェロイドを作製することに成功した。次に、（和文）に、スフェロイドの三次元形態を観察するための回転操作技術を開発し、スフェロイドを回転しながら全方位から観察可能なシステムを構築した。今後はこのシステムを用いてスフェロイドの形態情報と生化学特性の相関評価を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体に近い特性を持つ細胞凝集塊を大量生産する技術を開発することに成功した。本研究で提案する技術により、数百個の細胞凝集塊を約10分で作製することが可能となった。この技術により品質の揃った細胞凝集塊を大量生産することが可能となれば、それを用いて新規薬剤の評価を行うことや、再生医療用の生体組織を作製することが実現され、安全・安心な医療を広く提供することが可能となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this research, we proposed mass production method of cell spheroids based on a vibration-induced flow. Vibration-induced flow is local flow induced around vibrating microstructure. Thus, by patterning micropillars in ring arrangement on a chip and applying vibrations to the chip, vortex flow is induced at the center of the structures. By utilizing this vortex flow, we succeeded in forming cell spheroids. Furthermore, by patterning array of the structure, we succeeded in fabricating a few hundred cell spheroids. Next, we developed shape evaluation system of cell spheroids. We also used vibration-induced flow to evaluate 3D shape of cell spheroids. By rotating cell spheroids and observing with microscope, we can evaluate 3D shape of cell spheroids. We succeeded in developing rotation method of microobjects such as cell spheroids and demonstration of feedback control of orientation of microparticles. We will construct 3D shape information of cell spheroids with this system.

研究分野：マイクロナノロボティクス

キーワード：微細操作 マイクロロボティクス マイクロ流体 振動誘起流れ 細胞操作 細胞スフェロイド 音響流れ

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

従来、新薬開発の際には実験動物を用いた薬効評価が行われていたが、近年では倫理的問題や人体の特性との違いから、培養細胞を用いた薬効評価が行われるようになってきている。特に最近では、単なる細胞よりも、細胞を三次元的に凝集して作製した細胞凝集塊（スフェロイド）がより生体に近い特性を持つことが明らかになっており、細胞スフェロイドを用いた薬効評価の実現に向けた研究が行われている。また、再生医療分野においても、細胞スフェロイドを集積することにより、より生体に近い形態、特性を持った移植用の臓器を作製する研究が進められている。以上のように、創薬・再生医療などの分野で非常に注目されている細胞スフェロイドであるが、現状のスフェロイド作製方法には、形態及びスフェロイドの生化学特性の再現性の高さと、大量生産性を両立した方法が無い。そのため、生物系の研究室において手作業で行われているスフェロイド作製工程をロボットにより全自動化し、作製効率と再現性を上げる研究も行われているが、そもそもの作製効率と再現性が低いため、根本的な問題の解決とはなっていないのが現状である。

このような状況から、まず申請者は①再現性が高く、大量生産可能なスフェロイド作製方法は何か？という問いに至り、流体力を用いてスフェロイドを大量生産する着想を得た。さらに、大量生産に成功したとして実用化に至るためには歩留まりの向上と高品質化が必須であると考え、作製されたスフェロイドの特性、すなわち②スフェロイドの「品質」とは何か？どう評価できるのか？という問いに至り、スフェロイドの形態情報と生化学特性の相関を明らかにし、スフェロイドの品質を評価する本研究の提案に至った。

### 2. 研究の目的

本研究では、細胞スフェロイド産業の実用化を目指し、細胞スフェロイドの大量生産技術とスフェロイドの品質評価技術の確立を目的として研究を行う。本研究ではまず申請者独自の振動誘起流れという現象を用いた流体制御技術を利用した①スフェロイドを高速・並列に作製する大量生産方法を提案する。さらに、作製したスフェロイドの三次元回転操作・観察を行い、②スフェロイドの三次元形態情報から、スフェロイドの品質を評価する方法を確立する。

### 3. 研究の方法

前述の目的を達成するために、本研究では下記2点をマイルストーンとして研究を行う。

- ①細胞スフェロイドの高効率作製法の実現
- ②作製されたスフェロイドの三次元形態情報による品質評価法の確立

①に関して、従来マイクロ流体チップ中の旋回流を用いてスフェロイドを作製する方法はいくつか報告されており、高速かつ再現性良く作製可能であることが知られているが、カバーにより閉鎖された流路中での精密な流体制御が必要であるため並列化が難しく、さらに作製後のスフェロイドの回収が困難であるため、大量生産には適していなかった。本研究では、振動誘起流れというマイクロスケール特有の現象を利用した、申請者独自の微小流体制御技術を用いることにより、高速かつ再現性の高いスフェロイドの大量生産法を提案する。他のマイクロ流体技術と異なるこの方法の特徴として、カバーの無いマイクロ流体チップ上で並列に微小流体制御が可能であることが挙げられる。この方法を用いると、流体力によるスフェロイド作製方法のメリットはそのままに並列化が可能であり、かつ作製したスフェロイドの回収が容易であるため、スフェロイドの大量生産に適した作製方法が実現できる。

②に関しては、多くの生物系研究者が指摘している通り、品質の良いスフェロイドは形態からある程度判断できると言われている。なお、スフェロイドの品質とはスフェロイドの特徴が生体に近いことであるべきで、例えば薬効評価を目的とした場合は薬剤に対する応答性、再生医療を目的とした場合は作製した組織の生体への定着率、などの生化学評価により定量評価できると考えられる。スフェロイドの形態情報を画像から抽出する研究は以前にも行われているが、1枚の顕微鏡写真から二次元的な形態情報を得るものが主であった。しかし、三次元的な構造を持つスフェロイドの品質を評価するため



図1 振動誘起流れ

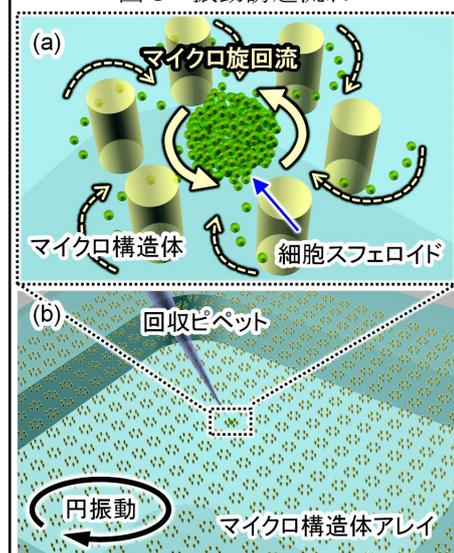


図2 提案するスフェロイド作製手法のコンセプト

には、三次元形態情報が必要であると考え、本研究では、振動誘起流れを用いてスフェロイドの三次元回転操作を行いながら画像を取得することにより、三次元的な形態情報を取得し、より精度の高い品質評価を実現する。取得されたスフェロイドの三次元形態情報と、生化学分析の相関を評価することにより、形態情報から品質を評価する方法が確立できると考える。

#### 4. 研究成果

まず、振動誘起流れを用いて細胞スフェロイドを作製する確認を行った。マイクロ流体チップ上でマイクロ構造体を円環状に並べることによって渦流れを発生させ、その流れを利用して細胞を凝集させてスフェロイドを作製することに成功した(図3 (a) (b))。また、図3 (a)に示す構造体では、スフェロイド作製の再現性が低かったが、図3 (b)に示す構造体では高い再現性でスフェロイドを作製することに成功した。それぞれの構造体の中心部での流線をPIVにより可視化したものを図3 (c) (d)に示す。この流線により、構造体の中心部まで流線が密に分布しているような流れを発生させることにより、高い再現性でスフェロイドを作製可能であることが分かった。また、様々な設計値の微細構造を作製し、それぞれの設計値におけるスフェロイド作製の成功率を評価した。結果として、幅の細い花びら上のマイクロパターンを使用した際に、作製の成功率と作製されたスフェロイドのサイズばらつきが小さいことが分かった。さらに、三次元的な流れが発生することにより、中心に吸い込まれるような流れが発生し、より多くの細胞を操作してスフェロイドが作製できることを確認した。

また、②のスフェロイドの三次元形態情報を取得するための観察系の構築を行い、スフェロイド形状を三次元的に評価する手法の検討を行った。まず、スフェロイド回収用のマイクロピペットの試作を行った。通常のガラスキャピラリーよりも大きな径のピペットを作製することでスフェロイドの回収には成功したが、吸引・吐出時にスフェロイドの形状が崩れてしまうことがあるため、高精度・高分解能なポンプ開発が必要となることが分かった。また、三次元形状の評価のために、スフェロイドの回転操作技術の開発を行った。マイクロ構造体をパターンニングしたチップに円振動と直線振動を印加することにより、 $10\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ 程度のサイズの微粒子の水平回転と鉛直回転を行えることを示し、制御のための物理モデルを構築した。また、マイクロ粒子とマウス卵子を対象とした回転操作実験を行い、画像認識を用いたフィードバック回転操作に成功した(図4)。

また、この円環状の構造体をマイクロ流体チップ上に並列で並べることにより、チップ上で同時に数百個のスフェロイドを十分程度で作製することにも成功した(図6)。この結果は、提案手法によるスフェロイドの大量生産の可能性を示すものであり、他のスフェロイド作製手法と比較して高い優位性を持つことを示す結果であると考えられる。今後は作製されたスフェロイドの再現性と、作製の最適条件を評価し、実用に向けた実験を行っていく予定である。

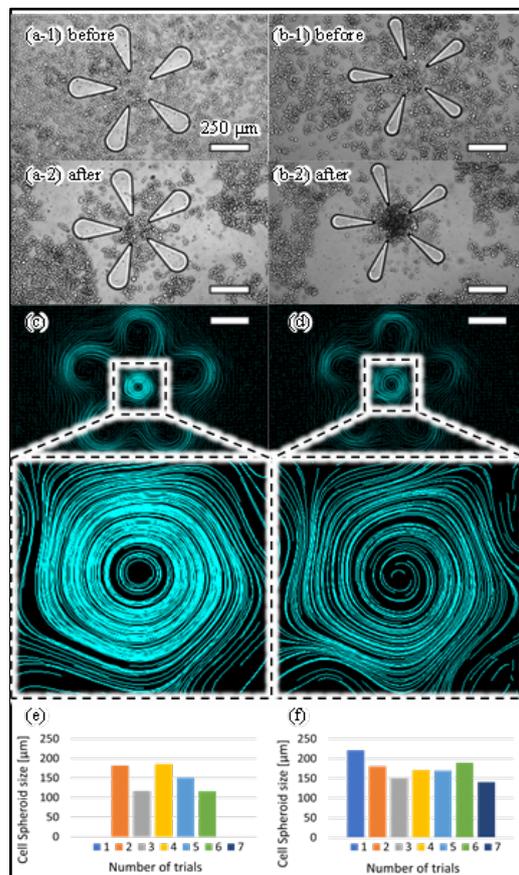


図3. 提案手法によるスフェロイド作製結果。(a) (b)作製実験の顕微鏡画像、(c) (d)それぞれの構造体周囲の流線、(e) (f)それぞれの構造体によって作製されたスフェロイドサイズ

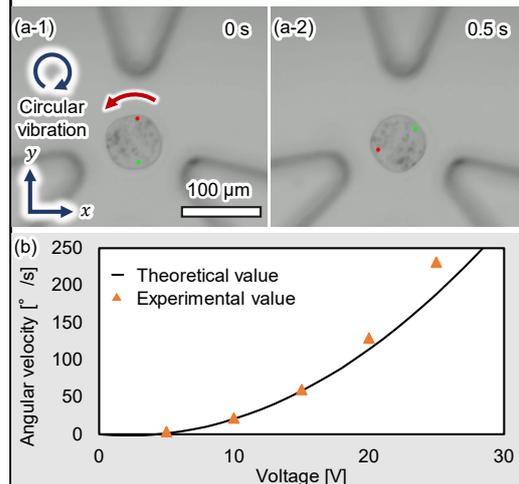


図4. スフェロイド形状観察のための細胞角度制御。(a) 実験画像、(b) 印加電圧に対する回転速度の評価

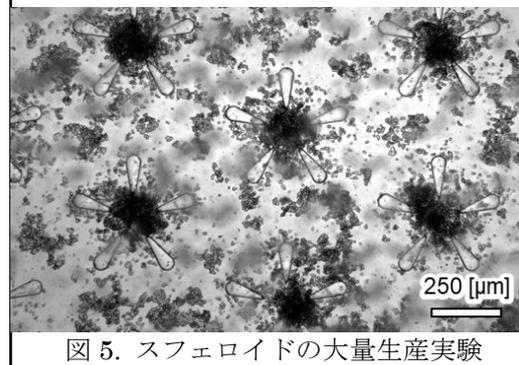


図5. スフェロイドの大量生産実験

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tang Tao, Hosokawa Yoichiroh, Hayakawa Takeshi, Tanaka Yo, Li Weihua, Li Ming, Yalikuln Yaxiaer	4. 巻 10
2. 論文標題 Rotation of Biological Cells: Fundamentals and Applications	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Engineering	6. 最初と最後の頁 110 ~ 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.eng.2020.07.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 小林 勇太, 早川 健
2. 発表標題 振動誘起流れを用いたマイクロ粒子の三次元回転操作
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2 0 2 0 (ROBOMECH2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 養島 七海, 早川 健
2. 発表標題 振動誘起流れを用いた細胞スフェロイドの作製と形状評価
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2 0 2 0 (ROBOMECH2020)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 勇太, 早川 健
2. 発表標題 微小物体の三次元回転操作に向けた振動誘起流れのPIV解析
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第42回研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松井駿幸, 鈴木宏明, 早川健
2. 発表標題 振動誘起流れを用いたマイクロミキサー
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2 0 1 9 (ROBOMECH2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 勇太, 早川 健
2. 発表標題 振動誘起流れを用いた微小物体の三次元回転操作
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2 0 1 9 (ROBOMECH2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 簗島 七海, 早川 健
2. 発表標題 振動誘起流れを利用した細胞スフェロイド作製法の検討
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2 0 1 9 (ROBOMECH2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 智士, 早川 健
2. 発表標題 ドライフィルムレジストを用いた多層マイクロ流体チップ
3. 学会等名 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2 0 1 9 (ROBOMECH2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 箕島 七海, 早川 健
2. 発表標題 振動誘起流れを利用した細胞スフェロイドの作製
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林 勇太, 早川 健
2. 発表標題 二軸振動印加を用いた微小物体の三次元回転操作
3. 学会等名 第20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
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nanami Minoshima, Takeshi Hayakawa
2. 発表標題 Parallel Formation of Cell Spheroids Based on Vibration-Induced Flow
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 宏明  (Suzuki Hiroaki)  (20372427)	中央大学・理工学部・教授    (32641)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------