

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：13904

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K20961

研究課題名（和文）「決定論的超並列単一細胞加工技術」の創成によるバイオ3Dプリンティングの革新

研究課題名（英文）Deterministic Massively Parallel Single Cell Processing: Towards Innovation in Bio-3D Printing

研究代表者

永井 萌土（Nagai, Moeto）

豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・教授

研究者番号：00580557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では「決定論的超並列単一細胞加工技術」の創成により、バイオ3Dプリンティングの革新を目指した。ペリスタポンプを搭載し、被覆用チャンバを独立させたピペットアレイを新たに開発した。この作製には吸引・吐出口、細胞用流路、空圧バルブを有した多層構造の形成を利用した。ピペットに外骨格と3軸リニアステージを設けて、治具で固定した。吐出用の溶液へ移動を可能とし、実験を安定化させた。捕獲や吐出性能は、表面張力と基板間相互作用も影響を与えた。細胞の位置固定技術としてバイオインクで細胞を固定する技術を確立した。バイオインク内でも細胞は増殖し、細胞はゲルを分解した。1週間の長期にわたり高生存率を保った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体外で緻密な多細胞組織を超並列で10の6乗個形成できれば、十分な細胞間相互作用により生体内の状態を再現し、腫瘍や臓器の生命現象を効率的に調査できる。従来のバイオ3Dプリンティングの配置では、トレードオフが存在しており、高い並列処理数と細胞個数の制御性は両立できなかった。本研究では、申請者の有する細胞操作技術、微細加工技術をベースに、構造を知能化・2Dアレイ化するアイデアを活用し、この配置原理を刷新することに成功した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to innovate bio 3D printing by creating "deterministic massively parallel single-cell processing technology". We developed a new pipette array equipped with a peristaltic pump and a separate chamber for encapsulation. This structure was fabricated by multi-layer soft lithography. Holes, cell channels, and pneumatic valves were integrated. The pipette was equipped with an exoskeleton and a 3-axis linear stage and fixed with a jig. The pipette was moved to the solution for dispensing, thus stabilizing the experiment. Capture and dispensing performance was also influenced by surface tension and substrate-substrate interaction. We established a technique for printing cells in bioink as a cell positioning technique. Cells grew in the bioink, and cells degraded the gel, maintaining high viability for as long as one week.

研究分野：バイオマイクロシステム

キーワード：超並列単一細胞操作 決定論的加工 光硬化 ペリスタポンプ 外骨格 バイオインク

1. 研究開始当初の背景

バイオプリンティングは生体外にて多細胞の生体組織の緻密な組織を作る技術である。細胞間相互作用を実現し、腫瘍や臓器の生命現象を効率的に調査できる。バイオプリンティングの従来のトレードオフ解消には、決定論的な超並列的単一細胞加工の確立が必要である。これまでの単一細胞マニピュレーションの並列化と自動化の実績に、知能化を取り込み、本研究の決定論的な超並列単一細胞加工に発展できると考えた。

①申請者は細胞を流体力で操作する 10×10 並列中空ピペットアレイを開発して、並列的に単一細胞を操作し、効率的にマイクロウェルアレイ中に輸送している (Nagai ら, Biomed. Microdev., 2015)。②さらにピペットを通過する電流を利用し、単一細胞を検出して配置する条件を見つけた (Nagai ら, Micromachines 2017)。③チャンバ中への単一の細胞トラップが可能のように構造を設計している (Nagai ら, IEEEJ Trans., 2014)。細胞操作、微細加工技術、構造の知能化を統合し、決定論的超並列単一細胞加工の技術創成、バイオプリンティングへの応用が可能だという着想を得た。

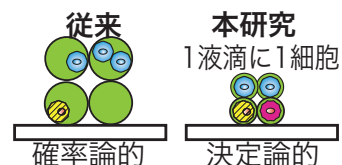


図 1 従来研究との比較

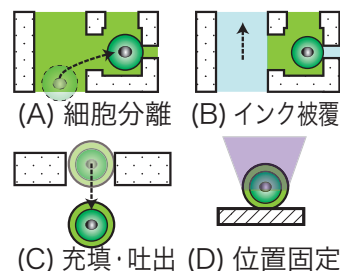


図 2 創成する決定論的超並列単一細胞加工技術

2. 研究の目的

従来のバイオ 3D プリンティングは、トレードオフが存在し、高い並列処理数と細胞個数の制御性は両立できなかった (図 1)。例えば並列ノズルで処理数を増やしても、確率論的な配置であり、単一個数、 $20\mu\text{m}$ 間隔といった距離の制御はできない。そのため細胞間相互作用の安定した再現が困難であり、変革が望まれていた。そこで本研究では、申請者の有する細胞操作技術、微細加工技術をベースに、構造を知能化・2D アレイ化するアイデアにより、原理を刷新することを目指した (図 2)。これらを発展させて、生体外にて多細胞の生体組織の緻密な組織を超並列的 (10^6 個) に作り、十分な細胞間相互作用を実現し、腫瘍や臓器の生命現象を効率的に調査する。細胞からの組織構築には、ヒト細胞 (直径約 $15\mu\text{m}$) のバイオインク懸濁液を吐出、硬化後に成熟させる。

3. 研究の方法

10^6 以上のオーダーで単一細胞を配置して、十分な数の病変モデルが構築できる細胞プリンタの構築を進めた。原理検証のために、スケールアップな方法を利用して、10 個単位で単一細胞を操作した。

ペリスタポンプの原理を搭載し、被覆用チャンバを独立させたマイクロマニピュレータアレイを開発した。吸引・吐出口、細胞用流路、空圧バルブの多層構造に成功した。ペリスタポンプによる送液は Python 3.0 を介して自動的に制御して、粒子や細胞の捕獲や吐出状態を評価した。

細胞の位置固定技術として、バイオインク (光照射後ゲル) 内の細胞を経過観察した。ゲル内細胞の増殖が確認され、細胞培養における指数関数的な増殖を示した。さらに細胞はゲルを分解した。1 週間の長期的な高生存率を保ち、細胞プリンタに有用な硬化条件と光硬化性ゲルであることを示し (光硬化性ゲル) 内での長期の細胞生存は確認されている。その一方で単一細胞レベルでの配置はされていない。単一細胞プリンティングするために、単一細胞レベルでの細胞とゲルの時系列変化を調査した。細胞の機能性、ゲルの生分解、固定後の位置ずれ、生存率等の観点より、最適な配置固定条件を求めた。

4. 研究成果

多層構造からなる 14×20 個の透明ピペットアレイを微細加工技術で形成した。図 3 は単一のピペットを示す。ピペット開口 (直径 $30\mu\text{m}$) と隣接したチャンバを並列に配置した。チャンバ上部に、流れ切替用にはバルブを設けた。(A) 捕獲時に細胞はチャンバ内の捕獲部 (高さ $5\mu\text{m}$) に向かった。捕獲後、チャンバへ向かう流れが止まり、単一細胞のみがトラップされた。(B) ミネラルオイル (油相) で押し出し、余分なインクを除去し、インクで被覆した細胞を得た。(C) 細胞捕獲後には、バルブを開け、ピペット開口部への輸送を試みた。細胞の付着により脱離が不十分であった。

$20\mu\text{m}$ 粒子による単一粒子捕獲実験では、駆動周波数 4Hz、駆動時間 90 s、駆動圧力 150 kPa、濃度 1.0×10^5 particles/mL が最適条件であった。単一粒子の捕獲率は 81% であった。ペリスタポンプを逆流するとフッ素系溶体に単一粒子が吐出された。しかし、被覆された粒子は

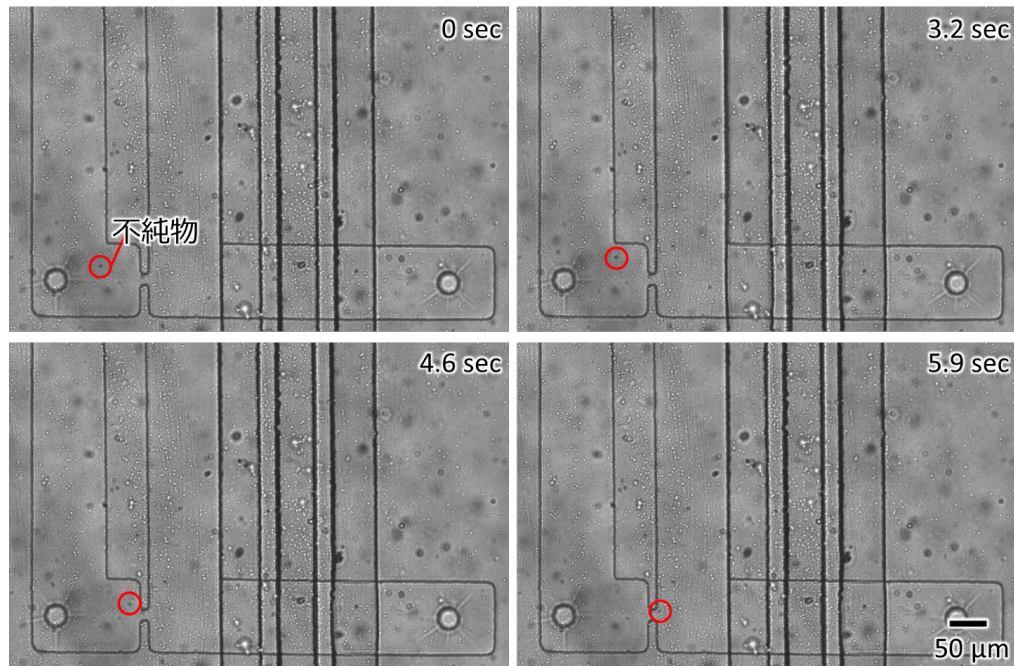


図 3 ペリスタポンプを搭載したピペットアレイによる送液実験-実験結果

吐出されなかった。小径の液滴が生成されるメカニズムにはフッ素系溶体とペリスタポンプが寄与している。ポンプを駆動し続けると小径の液滴が大量に生成された。ペリスタポンプを駆動すると液体は前後した。その際、フッ素系溶体が吸引・吐出口から流路内に引き込まれ、粒子懸濁液をせん断する。3つある空圧バルブを緩やかに加圧して吐出すると、単一粒子は振動せず吐出された。ただしフッ素系溶体の境界面が確認できなかった。粒子の濡れ性よりもSU-8基板の濡れ性が高いことや、SU-8基板が水で濡れていたことが考えられる。

光硬化によって作製したバイオインク（ゼラチンメタクリレート GelMA, 光硬化ゲル）を測定し寸法評価を行った。設計値との差は $3\sim 5\mu\text{m}$ であることから影響は少なかった。積算光量が $2000\text{mJ}/\text{cm}^2$ でパターン以外も硬化させ、オーバー露光となり、必要以上に大きな積算光量を与えた。

さらに GelMA 内に固定した直後の細胞の生死判別を行った。積算光量の増加に伴い、細胞生存率が減少傾向となり、最高細胞生存率が 40%程度であり、実用的ではないと考えられた。細胞の生死は積算光量の大きさだけでなく、光硬化性ゲルを作製する際の GelMA 濃度や LAP 濃度にも影響する。これらの濃度を変化させて、細胞生存率を向上させる方法を発見した。

GelMA 濃度が 10%w/v と比較して、GelMA 濃度が 5%w/v では高い生存率が確認された。細胞の最高生存率として積算光量 $1070\text{mJ}/\text{cm}^2$, $1280\text{mJ}/\text{cm}^2$ でおよそ 80%~90%の生存率を得た。より低侵襲な積算光量 800 , $900\text{mJ}/\text{cm}^2$ ではゲルの脱落や崩壊が見られた。積算光量の最適値は $1000\text{mJ}/\text{cm}^2$ である。また GelMA 濃度を抑えることが有効である。

ゲル内細胞の増殖が確認され、細胞培養における指数関数的に増殖した。細胞を固定したゲル面積を測定すると、5day で面積が大きく減少し、細胞によるゲルの生分解性が示された。また細胞の固定位置からの位置ずれは $30\mu\text{m}$ 以内であった。1週間後の長期的な高生存率を保っており、細胞プリンタに有用な硬化条件と光硬化性ゲルである。

GelMA 濃度 5%w/v, 積算光量 $1000\text{mJ}/\text{cm}^2$, 室温 28°C で光硬化による細胞のゲル内固定を行い、0day から 3day までの長期的な細胞生存率を求めた。細胞の接着や増殖、ゲルの溶解が観察された。光硬化後 3 日間の日数経過を経ても細胞生存率は総じて 90%以上であった。同時にゲルの分解具合から光硬化における室温条件がゲルの硬化具合に大きく影響する重要なパラメータであることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nagai Moeto, Santra Tuhin Subhra, Shibata Takayuki	4. 巻 142
2. 論文標題 Standardized Outline of PDMS Microchips with Laser-cut Stacking Mold	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 43～47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejsmas.142.43	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 該当する
1. 著者名 TANIZAKI Kohei, SANTRA Tuhin Subhra, SHIBATA Takayuki, NAGAI Moeto	4. 巻 8
2. 論文標題 Microvalve actuated by <i>Vorticella</i>: self-oscillating valve and improvement measures to calcium-responsive valve	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mechanical Engineering Journal	6. 最初と最後の頁 21-00199
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1299/mej.21-00199	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Debnath Tanmay, Hattori Ren, Okamoto Shunya, Shibata Takayuki, Santra Tuhin Subhra, Nagai Moeto	4. 巻 12
2. 論文標題 Automated detection of patterned single-cells within hydrogel using deep learning	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-22774-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Nagai Moeto, Sato Shogo, Hiratsuka Shota, Kawaharada Sho, Okamoto Shunya, Santra Tuhin Subhra, Shibata Takayuki	4. 巻 143
2. 論文標題 Parallel Photothermal Coalescence of Biocompatible Photocurable PEGDA Droplets	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 IEEJ Transactions on Sensors and Micromachines	6. 最初と最後の頁 49～54
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1541/ieejsmas.143.49	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 見富佳祐, Tiwari Anuj, 岡本俊哉, 柴田隆行, 手島美帆, 永井萌土
2. 発表標題 単一細胞ノズルアレイの被覆・脱離効率を改善する空圧バルブの導入
3. 学会等名 2021年度精密工学会秋季大会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Anuj TIWARI, Keisuke MITOMI, Kentaro TANAGI, Takayuki SHIBATA, Moeto NAGAI
2. 発表標題 Transparent Micro-nozzle Array for Parallel Single-Cell Printing: Development and Fluid Simulation
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 藤井 敦司, 比佐 健人, 山根 大輔, 柴田 隆行, 永井 萌土
2. 発表標題 表面張力バルブと真空駆動ポンプの統合による単一細胞解析用の並列流体制御技術の開発
3. 学会等名 第11回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永井萌土
2. 発表標題 超並列単一細胞加工：基盤技術と応用展開
3. 学会等名 令和3年電気学会全国大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 比佐 健人 , 藤井 敦司, 柴田 隆行, 永井 萌土
2. 発表標題 SU-8 微小開口と真空駆動ポンプの統合による並列マイクロ流体輸送技術の開発
3. 学会等名 第37回 「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 福永 健, 鈴木 裕也, 鹿毛 あずさ, 柴田 隆行, 永井 萌土
2. 発表標題 超並列3D細胞アセンブリのための低侵襲なGeIMA内への光照射細胞配置技術の開発
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス 講演会2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>豊橋技術科学大学ハイスループットマイクロ・ナノ工学研究室 https://hmn.me.tut.ac.jp/ Researchmap 永井萌土 https://researchmap.jp/moeto 豊橋技術科学大学 教員紹介 永井萌土 https://www.tut.ac.jp/university/faculty/me/667.html</p>
--

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	沼野 利佳 (Numano Rika) (30462716)	豊橋技術科学大学・エレクトロニクス先端融合研究所・教授 (13904)	

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			
インド	インド工科大学マドラス校			