

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04853

研究課題名（和文）再生軟組織内部に微小磁気駆動パーツを機能的に分散配置した能動型灌流システムの開発

研究課題名（英文）Development of active perfusion system where minute magnetic-drive parts are functionally distributed inside regenerated tissues

研究代表者

井上 健司（INOUE, Kenji）

山形大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：40203228

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：収縮・膨張を繰り返してポンプの役割を果たす微小磁気駆動パーツを開発・量産し、再生軟組織内部に分散配置して外部磁場により駆動することで、組織自体が能動的に灌流（組織に培養液を流すこと）を発生・制御する方法を提案した。組織モデルの線維芽細胞を包埋培養するコラーゲンゲルに複数個のパーツを埋入し、ディッシュに入れて全体を培養液に浸した状態で、磁場を周期的に印加し続けた結果、培養液の灌流が発生し、細胞の増殖・活性化が促された。以上の結果から、本研究で提案した灌流パーツが細胞培養に有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPS細胞を用いた疾病のモデリングと創薬スクリーニングには、再生医療に匹敵する重要性和市場価値があるとされている。しかし、3次元再生組織を構築する際に、組織深部にある細胞に栄養を供給できなければ、生体に近い組織の状態を再現できず、疾病モデリングや創薬スクリーニングの有効性と特異性が損なわれてしまう。本研究の成果により、組織外部からポンプなどで内部に培養液を流し込む従来法では困難だった、組織全体にわたる栄養供給が可能となり、疾病モデリングと創薬スクリーニングの分野に大きく貢献できる。

研究成果の概要（英文）：An active perfusion system for regenerated tissues is proposed. Minute magnetic-drive parts which repeat expansion and contraction and serve as pumps are developed. The parts are distributed inside the tissues and driven by external magnetic field. The system actively generates and controls perfusion of culture solution inside the tissues. Cell culture experiments are conducted. Collagen gel is populated with fibroblasts as tissue model, and some minute magnetic-drive parts are embedded in the gel. These are dipped into culture solution in a culture dish. By applying external magnetic field periodically, perfusion of culture solution is generated, and cell proliferation and activation are promoted. The results show that the proposed method is effective for cell culture.

研究分野：ロボット工学

キーワード：再生組織 灌流 磁気駆動 細胞培養 精密ステージ

1. 研究開始当初の背景

3次元的な再生組織の構築は、常に組織深部にある培養細胞に対する栄養供給と老廃物排除の難題に直面してきた。その解決策として、組織構築の際に灌流（培養組織に液体を流すこと）用の流路構造を作りこむ方法や、内皮細胞の血管新生能力を利用して毛細血管のような構造を組織内部に発生させる方法が報告されている。近年では、3D バイオフィブリケーション技術を利用して、この難題を克服しようという試みが期待されている。しかし、これらの灌流法は、組織外部に設けたポンプなどで内部に培養液を流し込むだけである。そのため、組織内部の灌流量の配分と調節ができないので、組織の至るところに有効な灌流を発生させることが難しい、構築した流路が長期培養中の細胞のリモデリング作用により崩れて灌流が消失するという欠点がある。

2. 研究の目的

本研究では、収縮・膨張を繰り返してポンプの役割を果たす微小磁気駆動パーツ（以下、灌流パーツとよぶ）を開発・量産し、再生軟組織内部に分散配置して外部磁場により駆動することで、組織自体が能動的に灌流を発生・制御する方法を提案する。

組織モデルの線維芽細胞を包埋培養するコラーゲンゲルを利用して培養実験を行い、培養細胞の代謝状況を調べることで、灌流パーツにより培養液の灌流が発生し、細胞の増殖・活性化が促進されるかを検証する。

3. 研究の方法

(1) 灌流パーツ

提案する灌流パーツの構造と動作原理を図1に示す。灌流パーツは、鉄粒子を含むポリウレタンの微小チューブである。外部から磁場をかけると鉄粒子が引き寄せられて収縮し、磁場を取り除くとポリウレタンの弾性によって元に戻る。よって、磁場を周期的に印加することで収縮・膨張を繰り返し、ポンプのように動作する。目標とする灌流パーツのサイズは、長さ・内径ともに300 μ m~1mmとした。

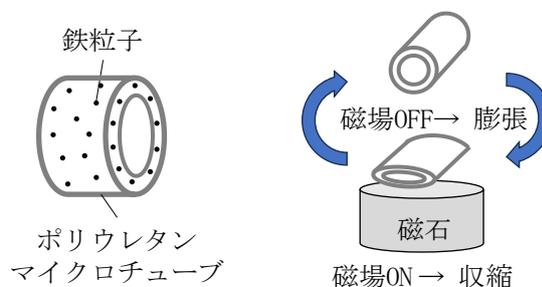


図1 灌流パーツ

(2) 灌流パーツの作製方法と自動作製装置

提案する灌流パーツの作製手順を図2に示す。

- (a) 灌流パーツの内径と同じ太さの金属線（またはガラス棒）を油の中に入れ、表面に油を付着させる。これは、滑りを良くして(f)で灌流パーツを外しやすくするためである。
- (b) 金属線に付着している余分な油を拭き取る。
- (c) テトラヒドロフランにポリウレタンを溶かした溶液に、灌流パーツの長さ+ α だけ金属線の先端を浸し、取り出す。
- (d) (c)が乾燥する前に、直径5 μ mの鉄粒子が多数入った秤量瓶の中に金属線を入れ、ポリウレタン表面に鉄粒子を付着させる。金属線を取り出して乾燥させると、鉄粒子がポリウレタンに固定される。
- (e) このままでは先端がふさがっているので、テトラヒドロフラン溶剤に金属線の先端を α だけ浸し、先端を溶かす。
- (f) 金属線から灌流パーツを取り外す。

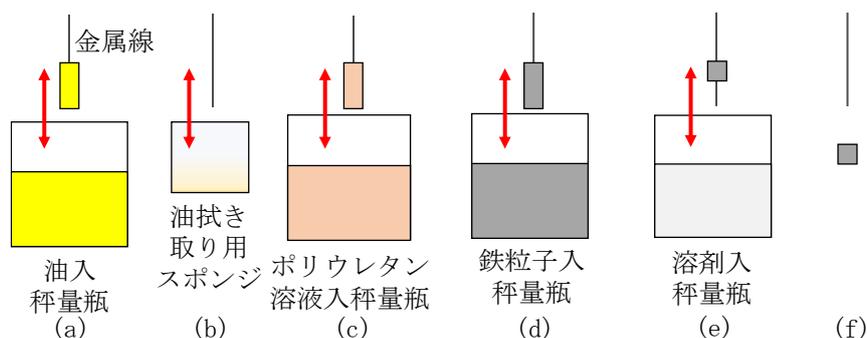


図2 灌流パーツの作製方法

灌流パーツを大量に作製するため、上記の手順を自動化した図3の装置を開発した。図2の

(a) (c) (d) (e) の秤量瓶と (b) のスポンジ、(f) の灌流パーツ取り外し機構を XYZ ステージのテーブルに設置し、手順に従って金属線を XYZ ステージで動かす。灌流パーツ取り外し機構を図 4 に示す。プッシュソレノイドの先端と対面の壁には、柔らかい材料が取り付けられている。XYZ ステージで両者の間に金属線を移動した後、ソレノイドを動かして灌流パーツを挟み、金属線を上昇させて灌流パーツを引き抜く。

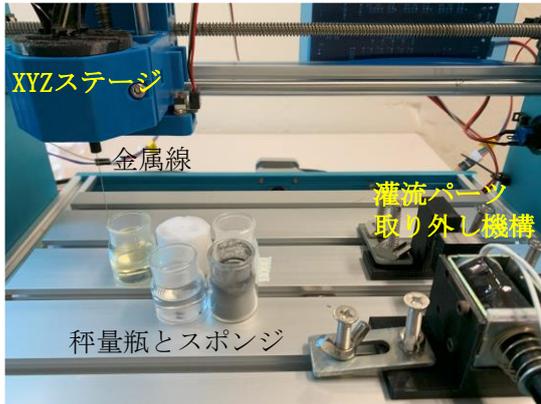


図 3 灌流パーツの自動作製装置

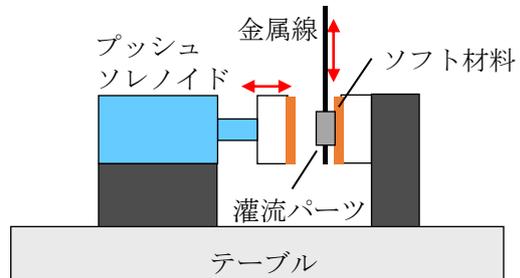


図 4 灌流パーツ取り外し機構

(3) 灌流パーツの磁気駆動装置

細胞培養を行うインキュベータ内で灌流パーツに周期的な磁場を印加し続けるため、図 5 に示す駆動装置を開発した。モータの回転軸に、スライダ・クランク機構を介してリニアガイドが連結されており、リニアガイドの先端にはネオジウム磁石が付いている。モータを回転させると、ネオジウム磁石が上下に往復運動する。灌流パーツが入ったディッシュを図のような台に載せ、下から磁石を遠ざけたり近づけたりすると、強弱が周期的に変化する磁場を灌流パーツに加えることができる。

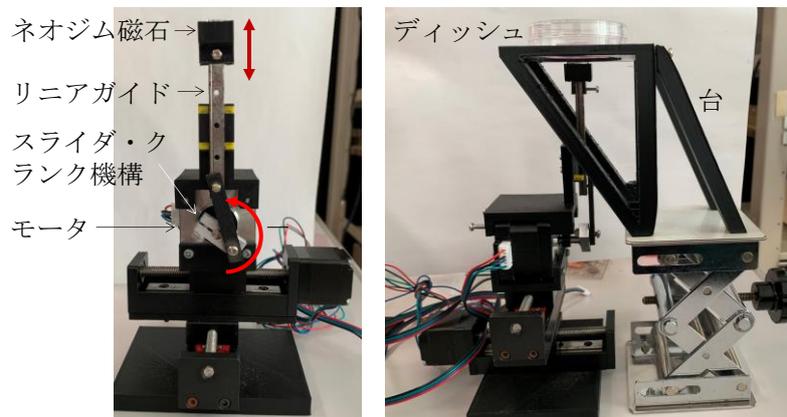


図 5 灌流パーツの磁気駆動装置

(4) 金メッキを施した鉄粒子の細胞培養適合性実験

灌流パーツを再生軟組織内部に配置する場合、鉄粒子の細胞培養適合性が問題となる。そこで、金メッキ（金膜厚さ：0.20 μm ）を施した鉄粒子を含むポリウレタンフィルム表面にラット胎児由来線維芽細胞を播種する培養実験を 7 日間行った。

(5) 細胞培養実験

提案手法の有効性を検証するために、細胞培養実験を行った。実験方法は以下の通りである。

- (a) 金メッキを施した鉄粒子を使って、長さ 300 μm 、内径 1 μm の灌流パーツを 3 個作成し、それらの穴に 1 本のナイロン線を通して数珠繋ぎにする。ナイロン線を通すのは、灌流パーツを寝かせた状態にするためである。
- (b) 組織モデルの線維芽細胞を包埋培養するコラーゲンゲルに (a) の灌流パーツを埋入し、培養ディッシュに入れ、全体を培養液に浸す。このサンプル培養ディッシュを 2 個用意する。
- (c) 2 個のディッシュをインキュベータに入れ、一方には図 5 の磁気駆動装置で周期的な磁場を印加し、他方には磁場を印加しない。磁気駆動装置の往復運動の周期は 1Hz、ストロークは 20mm とした。
- (d) 7 日間培養した後、顕微鏡観察やカルセイン染色により、細胞の変化を評価する。

4. 研究成果

(1) 作製した灌流パーツとその駆動性能

長さ1mm、内径300 μ mの設計仕様で作製した灌流パーツをマイクロスコープで撮影した1例を図6(a)(b)に示す。図から、チューブ構造ができていることがわかる。画像処理ソフトで測定した結果、長さは1.07mm、穴を楕円近似したときの長径は313 μ m、短径は202 μ mであった。

作製した灌流パーツにネオジム磁石(直径13mm、長さ10mm、表面磁束密度0.48T)で磁場を加え、収縮・膨張(元の形状に回復)が可能かどうかを検証した。図6(b)は磁石を遠ざけたときの灌流パーツ、図6(c)は磁石に付着させたときの灌流パーツである。図から、磁場を印加すると、灌流パーツが収縮することがわかる。また、磁石を一旦近づけてから遠ざけると、元の形状に回復することも確認した。さらに、磁石を20mm以上遠ざけると、灌流パーツは変形しなかった。画像処理ソフトで穴の面積を測定したところ、図6(b)は0.043mm²、図(c)は0.025mm²で、58%に収縮していた。

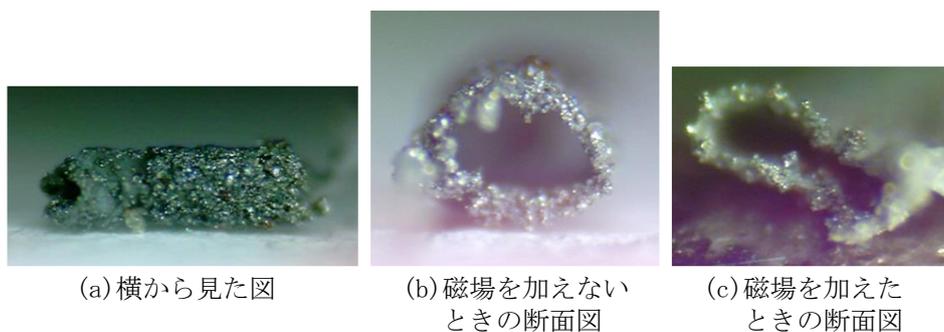


図6 作成した灌流パーツ

(2) 金メッキを施した鉄粒子の細胞培養適合性実験の結果

金メッキを施した鉄粒子を含むポリウレタンフィルムに線維芽細胞を播種する培養実験を行った結果、金メッキした場合にポリウレタンフィルム上の細胞数はメッキしない場合より約4倍に高く、ディッシュでの培養と較べて8割の細胞数になったので、金メッキが鉄粒子の細胞培養適合性を高めることを確認した。

(3) 細胞培養実験の結果

培養実験後のコラーゲンゲルの画像を図7に示す。「磁場なし」に対する「磁場あり」のコラーゲンゲルの面積は、0.8倍であった。このコラーゲンゲルが縮む現象は、線維芽細胞とコラーゲン繊維との相互作用に基づくものであり、線維芽細胞が活性化されたことを示唆している。

平均細胞個数を調べた結果を表1に示す。表から、「磁場なし」に比べて「磁場あり」のほうが、細胞数が増加している。さらに、その増加率は、灌流パーツから遠いところでは1.2倍なのに対し、灌流パーツに近いところでは1.8倍となっている。このことから、灌流パーツにより、その周囲に培養液の灌流が発生し、細胞の増殖・活性化が促されたと推測できる。

以上の結果から、本研究で提案した灌流パーツが細胞培養に有効であることが示唆された。

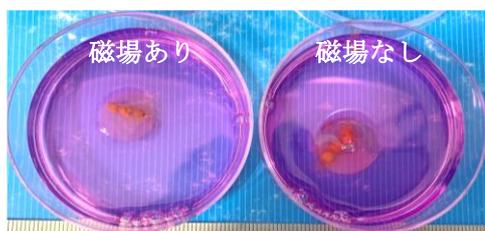


図7 培養実験後のコラーゲンゲル

表1 培養実験後の平均細胞個数

	灌流パーツから遠い	灌流パーツに近い
磁場なし	3.00	2.40
磁場あり	3.67	4.40

※顕微鏡10倍画像 0.79mm²あたり

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東山侑太、川口敏史、馮忠剛、井上健司
2. 発表標題 再生軟組織内部に灌流を発生させるための微小磁気駆動パーツの開発
3. 学会等名 第40回日本ロボット学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田佑里香、川口敏史、井上健司
2. 発表標題 2本の垂直マイクロフィンガーと顕微鏡用ステージを併用した微小物体の自動ピックアンドブレース
3. 学会等名 日本機械学会東北支部第58期総会・講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 東山侑太、川口敏史、馮忠剛、井上健司
2. 発表標題 再生軟組織内部に灌流を発生させるための微小磁気駆動パーツの自動作成装置
3. 学会等名 第41回日本ロボット学会学術講演会
4. 発表年 2023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	馮 忠剛 (FENG Zhonggang) (10332545)	山形大学・大学院理工学研究科・教授 (11501)	

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
---------	---------