

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：33903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25820093

研究課題名(和文)再生医療による三次元臓器構築のための細胞モニタ

研究課題名(英文) Cell monitoring system for the construction of three-dimensional organ in the tissue engineering

研究代表者

山田 章 (Yamada, Akira)

愛知工業大学・工学部・准教授

研究者番号：20377815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、再生医療の普及に伴って臨床現場で必要となる、組織前駆体の生育状態のモニタシステムの開発に取り組んだ。細胞を観察するための微小カメラと、呼吸状態をモニタするための微小半導体イオンセンサを組み合わせ、一体化した観察・計測部を試作した。また、周辺のシステム構成要素として、計測用センサアンプ、およびセンサ信号の処理と表示を兼ねたPC用ソフトウェアを開発した。また、細胞活性計測に用いる電位差計測法の中で、液間結合部に発生する電位差(液間電位)についても専用デバイスを構築して詳細な調査を行った。

研究成果の概要(英文)：We have developed a monitoring system for the observation and evaluation of the growing condition for the precursor tissue that is transplanted into the patients. We constructed a tissue monitoring system in conjunction with a micro camera and pH/PCO<sub>2</sub> sensor. The camera was used for the evaluation of cell morphology. The pH/PCO<sub>2</sub> sensor was used for the evaluation of the quantity of respiration of the cell or tissue. During this development, we especially constructed an amplifier for the sensor and a software for PC to control the measurement system. We have also investigated the liquid junction problem which was problematic under the measurement of pH values. The liquid junction produce a voltage that are called a liquid junction potential and cause a measurement error. We have investigated to this point by constructing a special device based on microfluidics.

研究分野：生体工学

キーワード：再生医療 ISFET pH pH-FET

## 1. 研究開始当初の背景

再生医療が目覚ましい発展を遂げている中、臨床応用を加速させるためには工学技術の導入が不可欠な段階になってきている。再生医療では、生体外で予め細胞を培養して組織や臓器を構築しておき、これらを生体内に定着させる。その前段階として、臓器形状の分解性の骨格内に細胞を播種・生育し、臓器の前駆体を作製する必要がある。重要な要素技術の一つに、骨格内に培養中に、細胞の生育状態を定量的かつ視覚的に把握する技術がある。

細胞は呼吸により二酸化炭素を排出して細胞外液を酸性化するため、周辺溶液の pH 値をモニタすることで細胞の活性を把握できる。また、細胞の形態及びその変化は生育状態の指標として通常用いられている。これら二つの技術を一体化したシステムを作製することで、再生医療における問題点の一つを解決できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、超小型のカメラ、光源、ISFET (Ion-sensitive Field-effect Transistor) をベースとしたガスセンサを内蔵した微小カテーテルの試作を目的とする。図1に試作カテーテルのイメージ図を示す。細径のカテーテルの先端に小型カメラ、照明用光源、pH 及び CO<sub>2</sub> 濃度測定用の ISFET センサを組み込まれる。

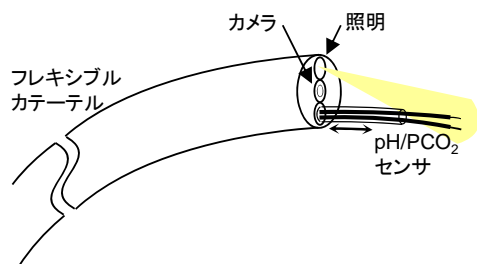


図1 三次元足場骨格内の細胞モニタ用カテーテルの概念図

図2には、試作カテーテルの使用状態のイメージ図を示す。生分解性樹脂により作製した骨格内に播種・生育された細胞を上述のカテーテルによりモニタする様子を示す。細胞培養中の骨格深部では、観察のためには光源が不可欠になるので、光源付きの微小カメラによって観察画像を取得する。図3には、細胞の形態観察データ、及び活性データを同時にモニタするためのシステムの概念図を示す。画像は取得画像に画像処理を施して評価しやすくする。また、活性データは、センサの取得信号を構成データ等を用いて処理することでリアルタイムにモニタできるようにする。

このようなシステムを開発することで、再

生医療の手法によって作製した臓器の状態を、体内埋め込み前に評価するための新たな方法論の構築を目指した。

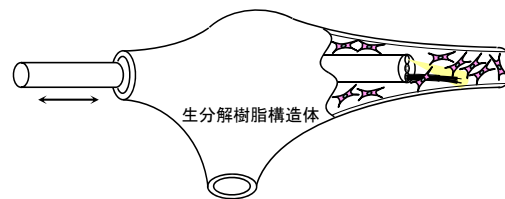


図2 培養中の細胞の観察・計測のイメージ図

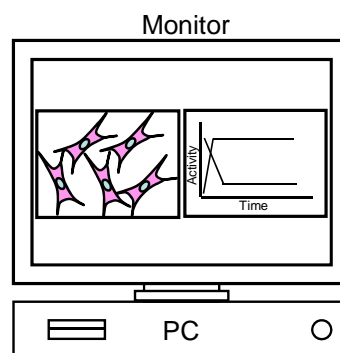


図3 PCによるデータ取得・解析システムの概念図

なお、研究を進める中で、細胞活性計測の根本原理である pH 計測法の中に新たな問題が顕在化した。比較電極における液間電位の形成に伴う測定誤差は、電位差計測法による pH 測定において不可避な問題である。この問題の解決案を探る中で、微小流体デバイスと ISFET センサを組み合わせた新しい計測システムの開発に至った。

## 3. 研究の方法

生分解三次元構造体の内部における細胞成育状態を視覚的、機能的にモニタ可能な微小カテーテルを開発するため、以下の要領で進めた。

- (1) 小型カメラによる観察系と、イオン・ガスセンサによる活性測定系の一体化

カメラの仕様検討、評価、使用方法、等の検討

- (2) 視覚・機能の両情報を同時にモニタし、記録できる計測システムの構築

汎用的な PC 上で使用できるよう、WindowsOS 用のソフトウェアを Visual Basic を用いて作製した。

(3) 奥部や狭所を持つ生分解三次元構造体の作製

我々がこれまでに構築してきた、熱溶融積層造形方式による生分解性樹脂の微細加工技術を発展させた。

構造体内部への播種成育手法をあわせて検討した。

(4) 微小流体デバイスと ISFET センサを組み合わせた、pH 測定システム

微小流体デバイスと ISFET センサを組み合わせた pH 測定システムの開発においては、試作デバイスを作製した後に計測システムを構築した。測定時の測定システムの応答性や測定誤差を評価した。

#### 4. 研究成果

(1) 小型カメラによる観察系と、イオン・ガスセンサによる活性測定系の一体化

図 4 に試作カテーテルの外観図および細部の構造を示す。光源一体型の微小カメラは市販品から選定した。pH/PCO<sub>2</sub>センサは、既所有品に僅かな加工を施して使用した。カメラとセンサの保持部は 3D-CAD で設計し、光造形方式の 3D プリンタにより作製した。内部部品の配置を最適化することで、外形をφ 9.5 mm まで小型化した。現状で入手可能な市販カメラサイズφ 5.5 mm では最小サイズに作製できた。

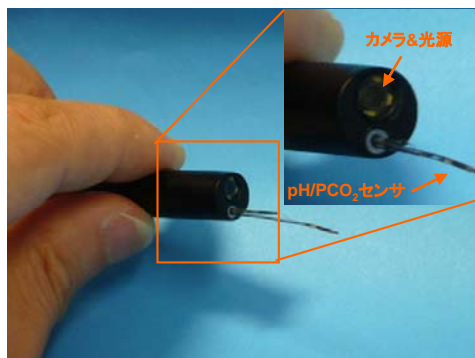


図 4 深部観察機能を備えた細胞活性評価用カテーテルの試作品の外観写真

(2) 視覚・機能の両情報を同時にモニタし、記録できる計測システムの構築

計測システムを構築し、センサ信号の取得、カメラ画像描写を確認した。

(3) 生分解三次元構造体の作製技術の向上

三次元の微細構造体を生分解性樹脂から作製するために、熱溶融積層造形装置及び造形手法を改良した。その結果、内部に空間を持つ球体(中空球体)の作成に成功した。

(4) 微小流体デバイスと ISFET センサを組み合わせた、pH 測定システムの開発

ガラス電極や ISFET センサ等の電位差計測法においては、測定の基準となる比較電極を常に濃度一定の塩化カリウム (KCl) 溶液に浸す必要がある。通常、液絡孔といわれる細孔を設けるが、ここで発生する液間電位が不安定であり、また電位差接触するに液間の組成の相違に依存して変動するために測定誤差の要因になる。

この問題を解決するために、微小流体デバイスを用いて、測定中にサンプル溶液と測定基準液を流動状態にして接触させることで、安定した液間結合を形成できることを発見した。

流動型の液間結合を形成することで、緩衝能の低い溶液(薄い溶液)に対しても電極の応答性が早くなり、測定時間が大幅に短縮し、さらに測定誤差が低減することが解った。これらを実現するためのメカニズムについても解明段階にある。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① Yuta Sasaki, Masashi Nobukuni, Akira Yamada, “A miniaturized microfluidic pH measurement device using ISFET sensors,” 2016 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), 査読有, pp. 128-130 (2016)

② Akira Yamada, Satoshi Mohri, Michihiro Nakamura, Keiji Naruse, “A Simple Method for Decreasing the Liquid Junction Potential in a Flow-through-Type Differential pH Sensor Probe Consisting of pH-FETs by Exerting Spatiotemporal Control of the Liquid Junction,” *Sensors*, 査読有, 15, pp. 7898-7912, 2015

③ Masashi Nobukuni, Akihiko Wakuda, Tsuyoshi Miura, Akira Yamada, “Expansion of a linear range of the ion-concentration measurement system using microfluidic device with ISFET sensors,” 2015 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), 査読有, pp. 80-81 (2015)

④Tsuyoshi Miura, Akira Yamada, “A simple ion concentration measurement system using a microfluidic device with ISFET sensors,” 2014 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), 査読有, pp. 103-106 (2014)

⑤Koji Matsuura, Yuka Asano, Akira Yamada, and Keiji Naruse, “Detection of *Micrococcus Luteus* Biofilm Formation in Microfluidic Environments by pH Measurement Using an Ion-Sensitive Field-Effect Transistor,” Sensors, 査読有, 13, pp. 2484-2493, 2013

⑥Akira Teramoto, Akira Yamada, “A simple estimation method of photosynthetic condition based on pH measurement using ISFET sensor,” 2013 IEEE International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS), 査読有, pp. 158-160 (2013)

[学会発表] (計7件)

①微小流体デバイスと ISFET センサを用いたインライン濃度モニタ, 三浦 剛、山田 章, 第25回日本コンピュータ外科学会大会特集号, J JSCAS 18(4), pp. 273-274 (2016), 2016年11月26日、東京工科大学蒲田キャンパス、東京都大田区西蒲田

②微小流体デバイスと半導体イオンセンサによる高精度 pH 測定法の開発, 信國真史、佐々木優太、山田 章, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, p. 1832A2-18b5 (2016), 2016年6月10日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市西区

③微小流体デバイスによるイオン濃度モニタの線形範囲の拡大, 和久田 暁彦、山田 章, 第54回日本生体医工学会大会, pp. 407-409, P1-5-3-A (2015), 2016年5月8日、名古屋国際会議場、愛知県名古屋市熱田区熱田西町

④微小流体デバイスによるイオン濃度モニタの超小型化, 佐々木優太、信國真史、山田 章, 第55回日本生体医工学会大会, p. 193, P2-N17 (2016), 2016年4月27日、富山国際会議場及び富山市民プラザ、富山県富山市大手町

⑤半導体センサ ISFET を用いた微小流体デバイスの開発, 佐々木優太、信國真史、山田 章, 日本機械学会東海支部第65期総会・講演会講演論文集, No. 163-1, 313 (2016), 2016年3月18日、愛知工業大学、愛知県豊田市

八草町

⑥微小流体デバイスによるインラインイオン濃度モニタ, 三浦 剛資、山田 章, 第53回日本生体医工学会大会, p. 47, 02-07-6 (2014), 2014年6月25日、仙台国際センター、宮城県仙台市青葉区青葉山

⑦水草の光合成活性測定システム —光強度依存性の簡便な評価手法の確立—, 寺本 晃、山田 章, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, (2013), 1A1-D14(1), 2013年5月23日、つくば国際会議場、茨城県つくば市竹園

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: pH測定デバイス  
発明者: 山田 章  
権利者: 学校法人 名古屋電気学園  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-249994  
出願年月日: 2015年12月22日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

名称: pH or Concentration Measuring Device and pH or Concentration Measuring Method  
発明者: Akira YAMADA, Michihiro NAKAMURA, Satoshi MOHRI, Keiji NARUSE  
権利者: National University Corporation Okayama University  
種類: Patent  
番号: Application No. 13/391,746, Issue Date, Patent No. 8815078, Attorney Docket No. YIP0002US, Confirmation No. 8922  
取得年月日: 08/26/2014  
国内外の別: 国外(米国)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 章 (YAMADA, Akira)  
愛知工業大学・工学部・准教授  
研究者番号: 20377815

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 研究協力者

成瀬 恵治 (NARUSE, Keiji)

毛利 聡 (MOHRI, Satoshi)

松浦 宏治 (MATSUURA, Koji)

寺本 晃 (TERAMOTO, Akira)

三浦 剛資 (MIURA, Tsuyoshi)

和久田 暁彦 (WAKUDA, Akihiko)

信國 真史 (NOBUKUNI, Masashi)

佐々木 優太 (SASAKI, Yuta)