

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26630100

研究課題名(和文)ニワトリ胚を用いたCube-to-Chip型血液循環プラットフォームの実現

研究課題名(英文)Cubic cardiovascular platform using a chick embryo

## 研究代表者

川原 知洋(KAWAHARA, Tomohiro)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・准教授

研究者番号：20575162

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)：本研究では、倫理的な敷居が低くかつ低コストで培養できるニワトリ胚を透明人工殻(Cube)内で長期培養しつつ、血管を外部のマイクロチップ(Chip)と連結することで、血液を循環させながら試験が行える全く新しいプラットフォームの構築を目指している。本研究課題では、プラットフォーム実現のための基盤技術として直径100 μm以下の血管を所望の位置に誘導させる技術を確立するとともに、誘導した血管を遠隔操作するための双腕型3自由度マニピュレータを開発した。

研究成果の概要(英文)：We propose a novel platform which consists of a cubic artificial eggshell containing a chick embryo for cardiovascular simulations. The cubic eggshell with PDMS membrane allows the total amount of oxygen to pass into the egg for the chick embryo culturing. In this project, we newly developed both a new methodology to induce blood vessels into multiple PDMS channels and a tele-operated 3-DOF micromanipulator to realize the proposed platform.

研究分野：バイオメディカルロボティクス

キーワード：循環器シミュレータ ニワトリ胚 マイクロマニピュレータ

### 1. 研究開始当初の背景

近年、動物実験の規制厳格化に伴い、欧州を中心に薬効評価など一部の実験については代替動物の初期胚を用いて試験を行う方法が盛んに研究されている。代替動物の中でも、本研究ではニワトリ胚(卵)に着目する。その理由として、有精卵は1個100円以下で入手でき、倫理的な敷居が低く、さらに、卵黄で成長するため、培養液などの栄養供給を必要としない。一方で、有精卵は卵殻で覆われているため内部を自由に観察・操作できないという本質的な問題がある。これに対し、酸素透過性の高いフィルムと透明容器を用いて人工殻を作成し、血管形成前の胚を容器に移して内部を観察しながら培養する方法があるが、これらの人工殻は最適な剛性や形状を考慮して設計されておらず、狙った部分を詳細に観察・操作することが難しかった。

以上の問題を解決するため、当該申請者は図1に示すような「高剛性の枠」と「酸素透過性を有する膜」から構成される透明人工殻を提案し、10日間程度の培養を70%の成功率で達成すると共に、自由自在な観察と操作を実現している。この時、図2のように壁面に微細血管網が張り付いて血液の流れを観察できることが確認でき、壁面の酸素透過性を制御することで血管が形成される位置が変化することを発見した。この知見に基づき、血管の接合方法に関する着想を得た。

### 2. 研究の目的

本研究では、上述のような利点のあるニワトリ胚を用いて、透明人工殻(Cube)内で長期培養しつつ、血管を外部のマイクロチップ(Chip)と連結することで、血液を循環させながら試験が行える全く新しいプラットフォームの構築を目指している。ニワトリ胚を用いる場合、最大の課題はどのように直径数100 $\mu\text{m}$ ~1mmの微細な血管をつなぐかという点にある。一般的に、生物の血管を接合するには外科的な方法を用いて血管の切断や縫合を行う必要があり、このような操作では多くの自由度を有する器具が必要になり、ロボット技術を用いたとしても難しい。そこで、本研究では図3に示すように2-STEPでの血管接合を提案している。透明人工殻の酸素透過性を部分的に変化させることで所望の部分に血管を誘導し、接合するための血管位置(自由度)を限定する。その後、マニピュレータ(ロボット)の微細操作によって針を人工殻の膜から貫通させ、血管に穿孔することで接続を実現する。

以上の点を踏まえ、本研究課題では血管の連結(接合)を達成するための、血管形成位置を誘導する技術と、ロボットによる微細操作技術の確立を目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

(1) 血管形成位置の誘導方法の確立：これまでに、透明人工殻の膜厚を変えて培養を行

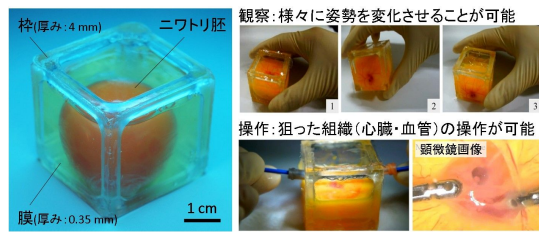


図1：透明人工殻の外観と機能

(枠：ポリカーボネート、膜：PDMS)

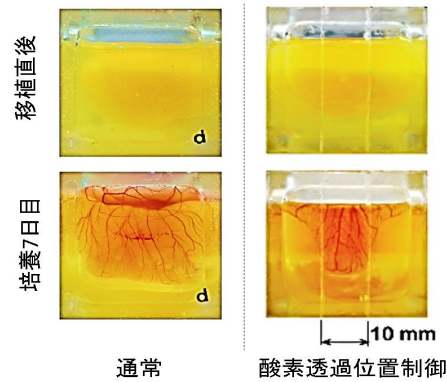


図2：酸素透過部位制限による血管形成位置制御

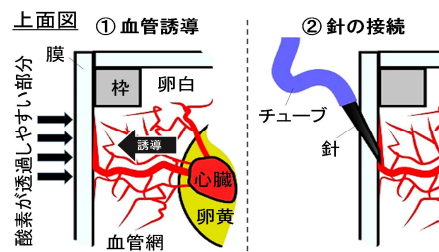


図3：2-STEP 血管接合

うと、膜厚を増加させるのに伴い供給される酸素量が低下し、ニワトリ胚の生存率も徐々に下がることを確認している。この結果を踏まえ、本研究では人工殻の酸素透過率のパターンを様々に変化させることで、血管の形成位置にどのように影響があるかを詳細に調べる。この時、膜の設計指針としては、ニワトリ胚が生存に必要な酸素量(286 mL/day)を確保しつつ、部分的に酸素透過量を変えるために、膜のパターン・厚み・表面形状を変化させる。ニワトリ胚については、従来提案している方法で人工殻を作製し、そのなかに移植を行なって、インキュベータ内で培養を行なった。なお、膜(PDMS)の表面に微細なパターンニングを行うために、フォトリソグラフィによる微細加工技術を用いた。なお、ニワトリ胚及び細胞を用いた実験に関しては、九州工業大学の動物実験委員会から「動物実験責任者」の認定を受けて実験を実施した。

(2) 3自由度マニピュレータの作製：サーボモータと回転ステージを組み合わせ、透明人工殻の近傍に設置できる小型の3自由度マニピュレータを作製し、制御ソフトウェア・遠隔操作用インタフェースも併せて開発する。その後、実際に構築したマニピュレータ

システムを用いて位置決め精度の評価を行う。この時の手先先端での位置決め精度は数 10  $\mu\text{m}$  を目指す。また、実際に血管を接合する際に針とチューブを把持するために、マニピュレータの先端に取り付けるエンドエフェクタについても検討を行なう。

#### 4. 研究成果

(1) 血管形成位置の誘導方法の確立：人工殻の酸素透過率のパターンを様々に変化させることで、血管の形成位置にどのように影響があるかを詳細に調べた。図 2 に示したように cm ~ mm サイズのスリット状のパターンを作製し、ニワトリ胚の血管網がどのように形成されるかを確認した。続いて、mm ~  $\mu\text{m}$  サイズのパターンを作製し、微細血管レベルでどのように血管が形成されるかについて観察と評価を行った。この際、ニワトリ胚の経時撮影については、これまでは培養時に血管の観察は多くても 1 日に 1 回程度が限度であった。理由としては、ニワトリ胚をインキュベータの外に出したり光を当ててしまうと極端に生存率が下がってしまうためである。そこで、インキュベータに窓を設けて光を瞬間的に当てながら窓越しに観察するシステムを構築し、数十分 ~ 数時間間隔での観察を可能とした。結果の一例を図 4 に示す。血管領域と主な太い血管網を画像処理によって抽出して評価を行った。これらの結果より、パターンの幅やサイズによる傾向は把握できたものの、パターンを微細化しても誘導の空間分解能は高々 cm レベルしか達成できないということが分かった。これは、酸素が拡散してしまうため、濃度を空間的に細かく制御できない結果、誘導された血管のパターンがある一定の広がりを持つことに起因する。

(2) 高精度血管誘導方法の確立：以上の点を踏まえ、図 5 (a) に示すように人工殻の外側に新しく空気チャンバーを備えたチャンネルを設けることで、血管の形成位置を高精度に制御する方法を新たに試みた。実際に図 5 (b) のようにニワトリ胚を培養しながら血管の誘導を行ない、血管を再現性良くチャンネルの内部に誘導できることを確認した。また、チャンネルのパターンの幅を小さくすることで、図 5 (c) に示すように最小で 100  $\mu\text{m}$  以下の血管でも誘導できることを明らかにした。さらに、図 5 (d) のように複数のチャンネルにも誘導ができることを明らかにした。また、このときニワトリ胚の生存率は培養後 14 日目で 70% 以上と比較的良好な結果を得ることができた。今後は、誘導できる血管径の最小値を検証するとともに、ニワトリ胚が正常に発育しているかについて調査を行なっていく予定である。

(3) 3 自由度マニピュレータの作製：AC サーボモータとピエゾ回転ステージを組み合わせて、透明人工殻の近傍に設置できる手のひら

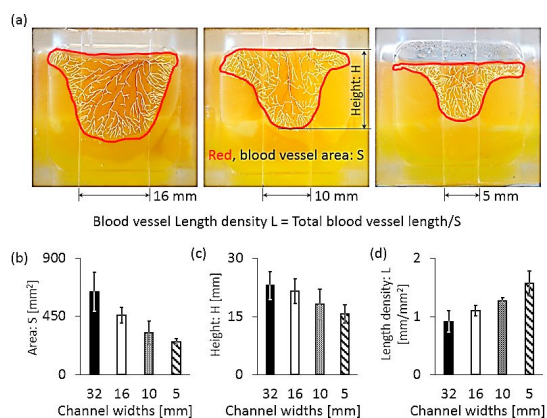


図 4：パターンの幅による血管形成の傾向  
(a) 画像処理結果 (b) 7 日培養後の血管領域: S  
(c) 血管形成領域の高さ: H (d) 血管密度

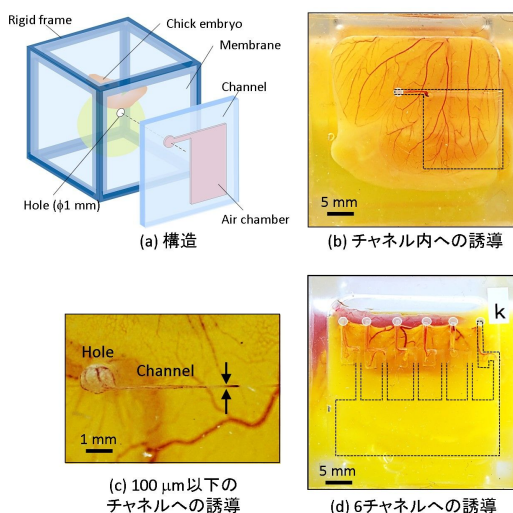


図 5：チャンネル内への高精度血管誘導

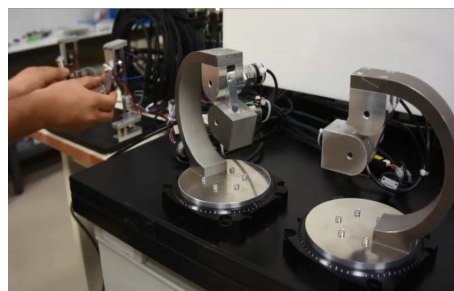


図 6：開発した 3 自由度マニピュレータの外観

サイズの小型の 3 自由度マニピュレータを開発した (図 6)。また、予備実験により手先位置決め精度が数 10  $\mu\text{m}$  であることを確認するとともに、マスター側による操作感の検証を行なった。また、双腕にすることで遠隔操作により血管の微細操作が可能であることを確認した。一方で、血管のマニピュレーションを行なっている際に、血管に穴が空いてしまう事に起因して、高い頻度で出血が生じることが確認できた。したがって、今後は先端に取り付ける微細操作が可能なエンドエフェクタを開発するとともに、血管誘導技術で位置決めした血管にアクセスを行なうための取り組みを進める予定である。

## 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2件)

Masaya Hagiwara, Tomohiro Kawahara, and Rina Nobata, Tissue in Cube: in vitro 3D culturing platform with hybrid gel cubes for multi-directional observations, Advanced Healthcare Materials, 査読あり, doi: 10.1002/adhm.201600167, in press, 2016.

Wenjing Huang, Fumihito Arai, and Tomohiro Kawahara, Egg-in-Cube: design and fabrication of a novel artificial eggshell with functionalized surface, PLoS ONE, 査読あり, 10(3), e0118624, 2015.

### 〔学会発表〕(計5件)

川原知洋, 黄文敬, 新井史人, Egg-in-Cube: ニワトリ胚培養のための機能性透明人工殻, 第38回日本分子生物学会年会/第88回日本生化学会大会合同大会, 2015年11月27日, 神戸ポートアイランド(神戸), 2015.

川原知洋, 黄文敬, 新井史人, Egg-in-Cubeアプローチを用いたマイクロ循環器シミュレータ, 第32回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2015年11月27日, 北九州国際会議場(北九州), 2015.

Wenjing Huang, Fumihito Arai, and Tomohiro Kawahara, Inducing blood vessel formation using cubic eggshell with patterned surface, IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2015年11月24日, Noyori Conference Hall (Nagoya), 2015.

Wenjing Huang, Fumihito Arai, and Tomohiro Kawahara, Chick embryo cultured in a cubic eggshell as a promising animal model, IEEE International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science, 2014年11月11日, Noyori Conference Hall (Nagoya), 2014.

Wenjing Huang, Fumihito Arai, and Tomohiro Kawahara, Design and fabrication of cubic eggshell containing chick embryo for a novel biomedical platform, 5th IEEE/RAS-EMBS International Conference on Biomedical Robotics and Biomechatronics, 2014年8月13日, Sao Paulo(Brazil), 2014.

### 〔図書〕(計1件)

Taisuke Masuda, Hirofumi Owaki, Tomohiro Kawahara, and Fumihito Arai, Bionic simulator based on organ-explant-chip, Tatsuo Arai, Fumihito Arai, and Masayuki Yamato (Eds.), Hyper Bio Assembler for 3D Cellular Systems, Springer, pp. 285-294, 2015.

### 〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞培養容器及び観察用試料セル

発明者: 萩原将也, 川原知洋

権利者: 大阪府立大学, 九州工業大学

種類: 特許

番号: 特許出願 2015-237526

出願年月日: 平成27年12月4日

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lsse.kyutech.ac.jp/~kawahara>

<http://www.kyutech.ac.jp/ttacademy/>

### 受賞など

1. Best Paper Award, International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Sciences [2015.11.25]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川原 知洋 (KAWAHARA, Tomohiro)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・准教授

研究者番号: 20575162

### (2) 研究分担者

大塚 弘文 (OHTSUKA, Hirofumi)

熊本高等専門学校・制御情報システム工学科・教授

研究者番号: 10223869

黄 文敬 (HUANG, Wenjing)

九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・研究員

研究者番号: 00633413