

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26709013

研究課題名(和文) バイオハイブリッドロボティクス創成に向けた3次元細胞アセンブリと筋組織形成

研究課題名(英文) Three-dimensional cell assembly and muscle tissue formation for biohybrid robotic system

研究代表者

秋山 佳丈 (Akiyama, Yoshitake)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：80585878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：生体と機械の融合による新たな機械システム(バイオハイブリッドデバイス)の創成において、細胞を微小構造体上へ3次元的に配置する技術の開発が求められている。本研究では、磁気アルキメデス効果と呼ばれる磁性の相対性を利用し、細胞を磁場により3次元的にアセンブリする技術を確立した。特に、心筋細胞を用いて、収縮能を持った微小な心筋組織を微小構造体に直接構築することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Bio-hybrid devices are based on the integration of living biological objects and artificial mechanical structures. We aim to construct a muscle tissue directly on a microstructure to realize a biohybrid device that utilizes muscle tissue as its actuator. In this study, we assembled rat cardiomyocytes around two micropillars three-dimensionally by magnetic levitation based on the magneto-Archimedes effect. Finally, we confirmed that the constructed myocardial tissues contracted in response to the electrical stimulation and the contractions deformed the micropillars.

研究分野：ナノマイクロシステム

キーワード：バイオハイブリッド 組織工学 バイオMEMS 磁気アルキメデス効果

1. 研究開始当初の背景

近年、半導体微細加工技術を利用した MEMS と呼ばれるマイクロマシン研究の進展に伴い、従来の物理法則を利用したマイクロアクチュエータやセンサだけではなく、細胞や生体組織を機械部品として活用しようというバイオハイブリッドデバイスに関する研究が注目を集めている。例えば、自律的に拍動を続けるラット心筋細胞を直接駆動源として用いることが出来れば、電気エネルギーが不要（グルコース等の化学エネルギーで駆動）、エネルギー変換効率が高い、生体親和性が高くソフト、自己修復が可能である等の従来の人工アクチュエータにはない特徴を持ったバイオアクチュエータと成り得る。

しかし、生体細胞を機械部品として利用しようというバイオハイブリッドデバイスの研究は、緒に就いたばかりであり、実用化に向けて、特に「細胞の耐環境性」、「3次元細胞アセンブリ法の確立」および「リソースとなる機能を持った細胞の供給」という3つの問題の解決が望まれる。研究代表者は、これまでに下等動物である昆虫の細胞に着目することで、「細胞の耐環境性」という問題を解決できることを示した。特に、従来バイオアクチュエータとして用いられてきた哺乳類の細胞は、37度および pH7.4 と厳密に制御された環境でしか培養することが出来なかったのに対し、変温動物である昆虫の細胞は、20~30度および pH6~8 と幅広い環境で培養することができる。この昆虫細胞を用いることで、室温かつ pH の制御不要で駆動可能なバイオハイブリッドを実証した。

一方で、研究代表者は、再生医療応用を目指した人体へ移植可能な3次元組織の生体外での構築を目標とし、細胞の超高速磁気アセンブリ法を提案しその検証を行ってきた。特に、磁場は非接触で物体を操作できるため、細胞のような非常にセンシティブかつ弱い物体のアセンブリに適していると考えられる。しかし、非磁性体である細胞を非標識で磁場により操作することは、そのままでは不可能であり、これまでは磁性微粒子等で細胞を標識することで磁場による操作が行われてきた。それに対し、研究代表者は、磁気アルキメデス効果に着目し、ラベルフリー磁気アセンブリを提案し、その有用性を検証してきた。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者の提案するラベルフリー磁気アセンブリ法を用いて、バイオハイブリッドデバイスの実用化に向けた問題のひとつである「3次元細胞アセンブリ法の確立」を目指す。特に、筋細胞をマイクロ構造体へ3次元的にアセンブリし、マイクロ構造体上でそのまま筋組織を構築する。以上により、従来の2次元細胞アセンブリでは困難だったより複雑なバイオハイブリッドデバイスの製造技術の確立に向けた足がかりとする。

3. 研究の方法

(1) ラベルフリー磁気アセンブリ

溶液中の粒子に作用する磁力 F_m は以下の式(1)で表すことができる。

$$F_m = \frac{(\chi_p - \chi_m)V}{2\mu_0} \nabla B^2 \quad (1)$$

ここで、 χ_p : 粒子の磁化率、 χ_m : 溶液の磁化率、 V : 粒子の体積、 μ_0 : 真空の透磁率、 B : 磁束密度である。溶液中の粒子に磁場を印加しても磁化率に差がないため、粒子は磁場からの影響を受けない。また、溶液中に磁性粒子が含まれる場合、 $(\chi_p - \chi_m)$ は正となるため、粒子に対して引力が働く。一方、正の磁化率を持つ溶液中に粒子が含まれる場合は、 $(\chi_p - \chi_m)$ が負となるため、粒子は相対的に反磁性体として振る舞い、粒子は磁場から斥力を受ける。その結果、粒子は磁力の弱い場所に凝集する。

(2) 磁石アレイの構築

ネオジム磁石 (1×30×5 mm, 2×30×5 mm), SUS430 プレート (1×30×5 mm) を使用した磁石アレイを Fig. 1 に示す。ネオジム磁石の同極に向かい合うように、かつ SUS430 プレートとネオジム磁石を交互に配列した。さらに、部分的に磁場が弱くなる磁場勾配を形成するために、ワイヤー放電加工で SUS430 プレートに深さ 2 mm の溝を加工した。この磁石アレイにおける磁束密度分布を、汎用 FEM 解析ソフトウェア (COMSOL Multiphysics ver.5.1, 計測エンジニアリング) を用いて求めた。

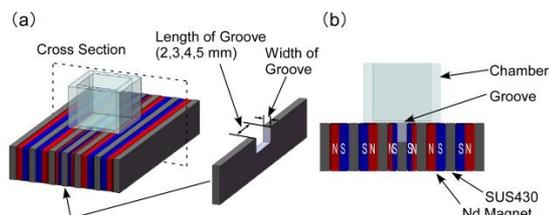


Fig. 1 (a) Schematic illustration of the experimental setup with the grooved SUS430 plate. (b) Cross sectional view of the experimental setup.

(3) 蛍光ビーズを用いた凝集形成

上述の磁石アレイにおいて、細胞を同等の比重及び磁化率をもつ蛍光ポリスチレンビーズを用いて、凝集実験を行った。磁気アルキメデス効果を活用するため、常磁性化合物である Gd-DOTA を 40 mM 含んだリン酸緩衝液を作製した。この溶液に蛍光ポリスチレンビーズ 2.0×10^4 個を懸濁し、ガラスチャンバーに導入した。特に、溶液の比重を変えることで、凝集体の凝集する高さの制御を、磁石アレイの真ん中の SUS430 プレートに加工する溝の形状を変えることで、凝集体の形状制御に関する実験を行った。

(4) 微小構造体上への筋組織形成

まず、培養液には、Gd-DOTA を 40 mM 含むかつ密度が 1.040 g/mL に調整された DMEM

を用いた。マイクロピラーを Polydimethylsiloxane (PDMS) にて作製し、ガラスチャンバーの底面に貼り付けた。そして、SUS430 の溝の真上にマイクロピラーが位置するようにガラスチャンバーをセットした。次に、新生児ラットから解離した心筋細胞を 8.0×10^4 個含んだ細胞懸濁液をガラスチャンバーに入れ、カバーガラスで蓋をした。

4. 研究成果

(1) 磁石アレイの磁力分布

磁場解析により得られた磁束密度分布に基づき、磁石アレイの断面 (Fig. 1b) における細胞 1 つにかかる磁力分布を求めた (Fig. 2)。磁力の向きは、チャンバー底面付近で上向きかつ、溝の中心に向かって傾いている。そのため、粒子は磁力と重力が釣り合う位置まで沈み、溝の上部に浮遊状態で棒状に凝集されることが予測される。

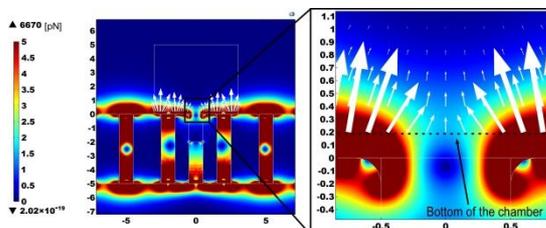


Fig. 2 Magnetic force distribution on the cross section in Fig. 1(a).

(2) 凝集する高さの制御

溶液の密度を 1.025, 1.030, 1.035, および 1.040 g/mL に変え、蛍光ビーズと溶液の密度差を調整することでアセンブリ高さを制御可能か検証した。チャンバーの底面からの距離を測定した結果を Fig. 3 に示す。溶液の密度が 1.025 g/mL から 1.040 g/mL の範囲で実験値がシミュレーション値とほぼ一致していることから、溶液の密度を調整することで、蛍光ビーズ凝集体のアセンブリ高さを制御することが可能であると考えられる。

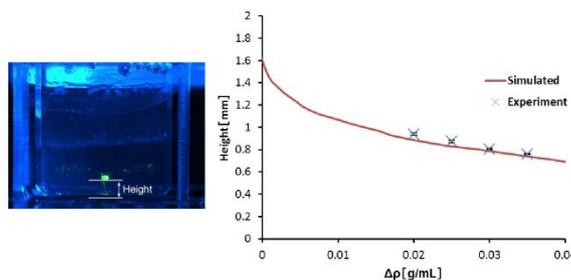


Fig. 3 Relationship between solution density and particle density difference and assembly height. Error bars mean SD.

(3) 凝集体の形状制御

溶液の密度を 1.040 g/mL に固定し、溝の長さを 2, 3, 4, および 5 mm の SUS430 プレートを用いて蛍光ビーズ凝集体の形状の変化を検証した。蛍光ビーズ凝集体の縦幅、横幅を測定した結果を Fig. 4 に示す。SUS430 プレートの溝の長さを長くすること

で蛍光ビーズ凝集体の縦幅は長くなっていることがわかる。このため、SUS430 プレートの溝の長さを調整することで蛍光ビーズ凝集体の縦幅の制御は可能であると考えられる。

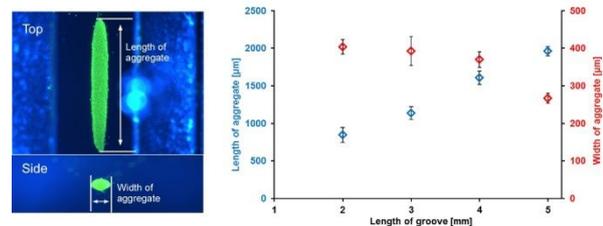


Fig. 4 Relationship between groove length of SUS 430 plate and width and length of fluorescent bead aggregate. Error bars mean SD.

(4) マイクロピラー間への細胞アセンブリ

心筋細胞をマイクロピラー間にアセンブリしてから 24 時間後に常磁性化合物を添加していない培地に交換し、5 日間培養を続けた。アセンブリしてから 5 日後の様子を Fig. 5 に示す。

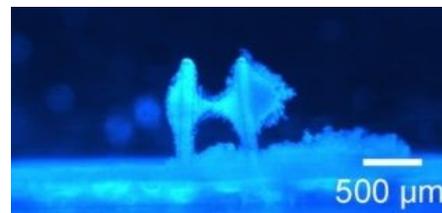


Fig. 5 Myocardial cell aggregate between micro pillars after 5 day.

(5) 筋組織の電気パルス刺激に対する応答

5 日間培養を続けた筋組織に、電気パルス刺激を加えることで、筋組織の周波数応答性を評価した。電圧 30 V, パルス幅 30 ms にて、1, 2, 3, 4, 5, 10 Hz の周波数のパルス刺激を与えた。100 fps で動画を撮影し、2 次元運動解析ソフトウェアを用いて解析を行い、ピラーの頂点の x 座標の変位を求めた (Fig. 6)。高速フーリエ変換により周波数分布を作成し、筋組織が収縮する周波数を確認した。各周波数のパルス刺激に対しても、筋収縮の周波数のピークは近い値を示していたが、4 Hz, 5 Hz と周波数を上げるにつれて、筋組織は弛緩しきる前に次の刺激が与えられ、完全に弛緩しなかった。

次に、筋組織の収縮力 P を、式(2)を使って求めた (Fig. 6)。

$$P = \frac{6DEI}{X^2(3L - X)} \quad (2)$$

ここで、 I はマイクロピラーの断面二次モーメント ($d^4/64$)、 E は PDMS のヤング率、 D はマイクロピラーの変位、 X はマイクロピラーの付け根から筋組織中心までの距離、 L はマイクロピラーの長さである。2 Hz の電気刺激パルスを加えた時の 1 回目の収縮時のマイクロピラーの変位量である $13.7 \mu\text{m}$ (Fig. 7)、 $X = 612.0 \mu\text{m}$ 、 $E = 1.8 \text{ MPa}$ を代入したところ、筋組織の収縮力は $1.58 \mu\text{N}$ と概算された。

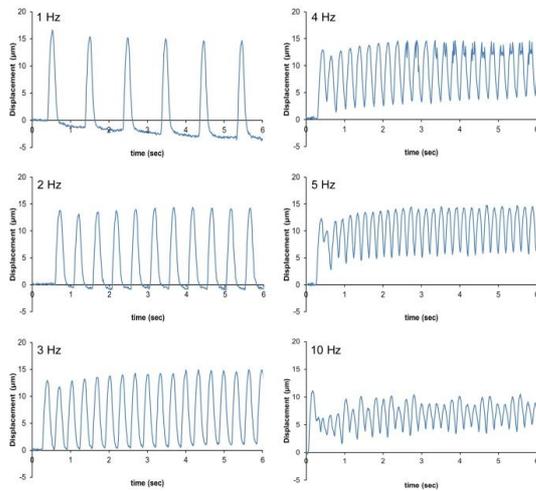


Fig. 6 Response of the micro pillar actuator to electrical pulse stimulation at each frequency.

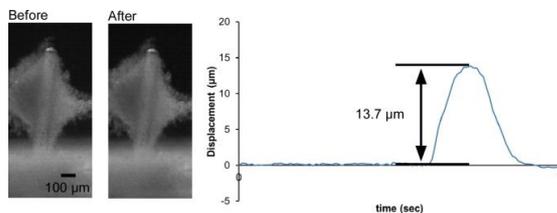


Fig. 7 Response of micro pillar actuator to single electric pulse stimulation at 2 Hz frequency.

(6) まとめ

本研究では、バイオハイブリッドデバイスの実用化に向けて、微小構造体上への3次元細胞アセンブリ法を実証した。特に、磁気アルキメデス効果に基づくラベルフリー磁気アセンブリ法により、蛍光ポリスチレンビーズの凝集体形成実験を行い、凝集体の高さおよびその形状が制御可能であることを示した。そして、最終的には、マイクロピラー間に心筋細胞をアセンブリし、収縮能をもった微小心筋組織が形成可能であることを示した。以上により、本手法は、バイオハイブリッドデバイスのための3次元アセンブリ手法として有用であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

秋山佳文, 逆転の発想で, 細胞を磁場であやつる, 生物工学会誌, 査読無, 2018, 96, p. 143.

秋山佳文, 磁気を使って細胞を任意形状に配置, ケミカルエンジニアリング, 査読無, 2017, 61, pp. 35-41.

K. Uesugi, K. Shimizu, Y. Akiyama, T. Hoshino, K. Iwabuchi, K. Morishima, Contractile Performance and Controllability of Insect Muscle-Powered Bioactuator with Different Stimulation Strategies for Soft

Robotics, Soft Robotics, 査読有, 2016, 3, pp. 13-22.

〔学会発表〕(計9件)

菱田豊, 秋山佳文, “磁気アルキメデス効果を用いた磁気走査型細胞パターンング—3次元磁気走査システムの構築とその評価—,” 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2017.

H. Suenaga, J. Sugihara, M. Horie, Y. Akiyama, “Direct Bioactuator Formation on Microstructure by Quasi-diamagnetic Assembly,” The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会).

Y. Akiyama, A. Watanabe, “Label-free Electromagnetic Spheroid Manipulation Based on the Magneto-Archimedes Effect,” 27th 2016 International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2016) (国際学会).

Y. Akiyama, J. Sugihara, “Direct muscle tissue formation between micropillars by label-free magnetic cell assembly,” The 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2016) (国際学会).

Y. Akiyama, “Assessment of electromagnetic device for label-free magnetic cell assembly,” International Conference on Biofabrication 2015(国際学会).

秋山佳文, “ラベルフリー磁気細胞アセンブリによる微小構造体上への直接的3次元組織構築,” 日本機械学会 2015年度年次大会.

秋山佳文, 森島圭祐, “ラベルフリー磁気アセンブリによるバイオマイクロロボットの創成 - マイクロ構造体への3次元細胞アセンブリ -,” 第15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.

Y. Akiyama, “Three-dimensional Biofabrication toward Biohybrid Microdevices,” The 15th International Union of Materials Research Societies, International Conference in Asia (IUMRS-ICA) (国際学会).

秋山佳文, 森島圭祐, “ラベルフリー磁気

アセンブリによるバイオマイクロロボットの創成 - マイクロ構造体への3次元細胞アセンブリ - ”日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014.

〔産業財産権〕

○出願状況（計1件）

名称：三次元造形体及びその製造方法
発明者：秋山佳丈，鈴木大介，湊遙香
権利者：国立大学法人信州大学
種類：特許
番号：特願 2018-059892
出願年月日：平成 30 年 3 月 27 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://biohybrid.chips.jp/>

6．研究組織

(1)研究代表者

秋山 佳丈 (AKIYAMA, Yoshitake)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：80585878