

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19300156
 研究課題名(和文) モニタリング機能を備えたピペット直接描画細胞アセンブリ装置の開発
 研究課題名(英文) Development of Direct Cell Assembly Technique with Micro-pipette

研究代表者
 梅田 倫弘(UMEDA NORIHIRO)
 東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授
 研究者番号：60111803

研究成果の概要：

本研究は、ティッシュエンジニアリング(組織工学)において重要となる任意配置・形状の細胞アセンブリやその修復(追加・除去)を可能とする技術の確立を目的とした。この目的のために、感温性ゲルを用いたラピッドプロトタイピング(RP)の押し出し法による細胞アセンブリを行う「マイクロピペット細胞アセンブリ法」を提案するとともに、昆虫細胞を利用して、培養実験を試みた。さらに、ゲル温度の低下によってゲル状態からゾル状態に可逆的に変化させて流動性を与え、培養細胞を回収できることを実験的に明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：精密計測工学

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：組織工学、アセンブリ、ラピッドプロトタイピング、ピペット、感温性ゲル、昆虫細胞、培養

1. 研究開始当初の背景

近年、生体組織を再生したり組織再生を工学的に取り扱うティッシュエンジニアリングが注目を集めている。また、細胞分子レベルだけでなく個々の細胞が外界とどのように相互作用しながら細胞全体で機能しているかを明らかにする研究が大きく進展している。これらの分野において工学的基礎技術として個々の細胞接着や成長の空間的な位置決めや制御を行う技術の開発が重要である。現在までに、次のような技術が提案されている。

マイクロコンタクトプリンティング法
(Y. Takii, et. al. JSME Int. J. Ser. C, 47,956(2004))

インクジェットプリンティング法(E. A. Roth, et. al., Biomaterials, 25, 3707(2004))
 ラピッドプロトタイピング法(Y. Yan, et. al., Biomaterials, 26, 5864(2005))

は、PDMS等の弾性体パターンによって接着蛋白質を細胞培養基板に転写させて所望のパターンの細胞培養を行う方法である。空間分解能が高く、同種のパターンを多数作るこ

とが可能であり、将来の大量組織を必要とする場合には優れた方法である。しかしながら任意のパターン形状が必要な場合や個々の細胞を任意の位置に配置させるなどの基礎技術の開発には向いていない。は、パソコン用プリンターの印刷方式であるインクジェット技術を利用した方法で、パソコンからのデータをあたかも印刷する様にして細胞をパターンニングできる手法として注目されている。しかしこの手法は比較的大きな面積の任意形状のパターンニングには適しているが、適用できる細胞の種類や培養液などに制限があり、開発途上といえる。は、マイクロピペットからゼラチンを射出して構造を作製する方法であるが、培養細胞の種類が限定され、細胞回収が難しい。

2. 研究の目的

本研究は、ティッシュエンジニアリング(組織工学)において重要となる任意配置・形状の細胞アセンブリやその修復(追加・除去)を可能とする技術の確立を目的とする。本研究は、10 に冷却されたマイクロピペットから細胞を含んだ熱可逆性培養担体を37 程度に設定された基板上に射出して、担体のゾル ゲル転移によりゲル化させてCADデータに基づく細胞アセンブリの自動化を行うこと、細胞培養後、基板を冷却して細胞回収が容易にできることが大きな特徴である。

3. 研究の方法

(1)ハイドロゲル

本研究では、培養基材としてハイドロゲルを用いる。ハイドロゲルとは、高分子が架橋されて三次元の網目構造を造り、構造内に水分子を持つ個体と液体の中間にあたる物質である。本研究で使用する熱可逆性培養ハイドロゲル(相転移温度 22)は、10 以下でゾル状態、22 以上でゲル状態に転移する完全合成高分子ゲルで、37 で完全にゲル状態となる。培地のほか、任意の細胞接着因子、薬剤と混合可能で、さらにゾル状態のハイドロゲルを希釈することで容易に溶解できる。

(2)RP 押し出し法

ラピッドプロトタイプングの押し出し法に基づいた細胞アセンブリを行なう(図1)。先鋭化したマイクロピペットから、冷却してゾル状態に保持した細胞が混合された培養ハイドロゲルを、30 程度に保温したディッシュ上に射出し、射出と同時に基板をプログラム操作する。射出されたハイドロゲルは、ディッシュ上で即座にゲル状態に転移し構

造を保持する。アセンブリパターンはコンピュータプログラム上でデザインし、プログラムと同様な細胞パターンを得る。

先端開口径 50 μ m 以上のマイクロピペットから細胞を混合した培養ハイドロゲルを射出し、ディッシュ上に直接細胞アセンブリを行なう。ここでハイドロゲル射出量は微小なため、通常の湿度環境では射出直後にゲル内の水分が蒸発し、細胞がダメージを受ける。これを防止するため、ミストによる加湿を行なう。液体と気体の混合による液体スプレーで微細な液滴径のミストを発生させ、アセンブリを行なうディッシュ空間の環境湿度を過飽和状態に保持する。液体スプレーはステージと同様に PC プログラムによって制御し、任意の周期でスプレーを行なう。

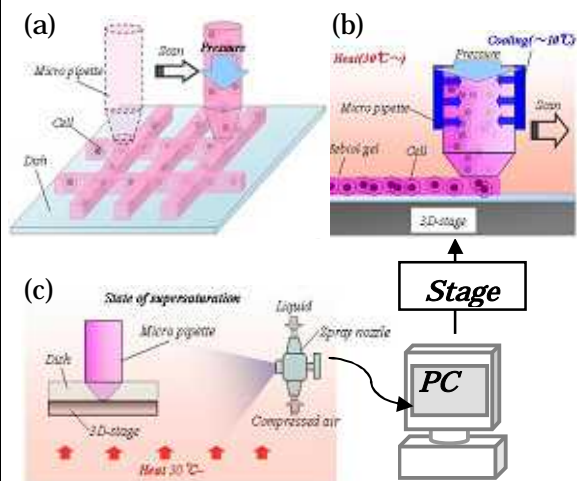


図1細胞アセンブリの原理；

(a) 全景, (b) 拡大図, (c) スプレシステム

細胞アセンブリの過程は以下の通りである。まず、コンピュータ上でアセンブリパターンのデザインを行い、ディッシュ空間の保温を開始する。続いてハイドロゲルの冷却、プログラムで設定した周期による液体スプレーを行う。ピペット内のハイドロゲルの十分な冷却とディッシュ空間を過飽和状態に保持後、液体スプレー下で細胞アセンブリを実施する。アセンブリ終了後、ディッシュ上に作製したハイドロゲル構造上に保温した培地を重層する。培地重層後、ゾル転移温度まで冷却する。ハイドロゲル構造はゾル状態への転移を開始し、重層した培地によって希釈され速やかに溶解を開始する。溶解中、細胞は下に沈み、完全に溶解後は細胞だけが残ってアセンブリパターンを保持し、PC プログラム上で作成した細胞パターンを得る。

4. 研究成果

(1)ハイドロゲル構造の作製

細胞アセンブリを実施するにあたり、アセンブリ精度を調査するために細胞を混合セ

ず、培養ハイドロゲルのみで構造体作製試験を行なった。スプレー用液体は細胞アセンブリ時に使用する 75%DPBS (Dulbecco phosphate buffered saline)とした。さらに、PMMA(アクリル)板をディッシュとして用いた。5mm 正方形構造の作製工程における CCD 顕微鏡像を図 2 に示す。これより、液体スプレー下でもピペット開口径に依存した精度で、ハイドロゲル構造が作製可能であることが確認できる。続いて液中での安定性を評価するため、作製した構造上に 30 程度に保温した培地を 3ml 重層した。これより、図 3 に示すように培地を重層した瞬間に構造が剥離した。さらに、図 4 のようにひび割れが発生し、構造の崩壊に至った。なお、この崩壊現象は保温温度が高いほど発生が促進され、重層培地量を 100 μ L から 3mL の間で変化させても同様に発生した。これより、液中でのハイドロゲル構造の安定性に課題があることが明らかになった。

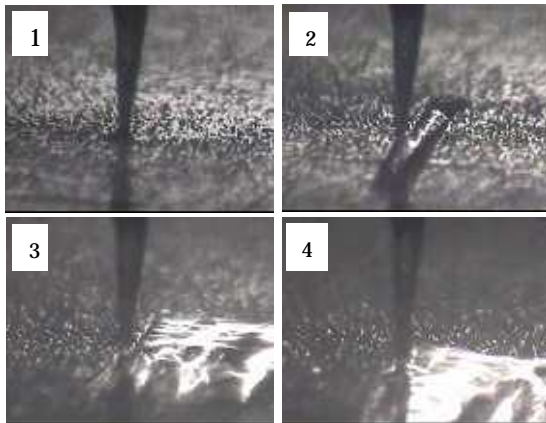


図 2 5mm 角の作製プロセス

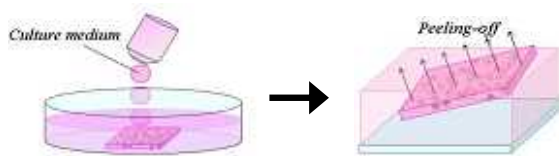


図 3 作製ハイドロゲルの剥離現象



図 4 作製ハイドロゲルパターンの崩壊

(2)安定化ハイドロゲル構造の作製

ハイドロゲルの安定化を図るため、培養ハイドロゲルにアラビアガム(GA)、# 400 メチルセルロース(MC)を混合した。毒性試験の結

果と接着力の両立を考慮し、GA 混合濃度は 0.01g/mL とした。また、ハイドロゲルの物性を考慮し、MC 混合濃度は 0.005g/mL とした。0.01g/mL GA-0.005g/mL MC 混合培養ハイドロゲルによって 5mm 正方形構造を作製した。作製後 30 程度に保温した DPBS を重層し 25~37 程度に保温した。これより、33 以上になると図 4 と同様に崩壊現象が発生した。一方、33 以下の範囲では安定的にディッシュ上に定着することがわかった。続いて、保温温度 33 から 5 程度まで冷却しハイドロゲル構造を溶解させた。その結果、温度に反応して速やかに溶解することが確認された。GA、MC を混合した結果、33 以下の液中ではハイドロゲル構造の安定性を向上することが出来た。この要因について接着に関しては、GA の接着性が効果的に作用したものと考えられる。また崩壊に関しては、33 以下の範囲ではハイドロゲルに混合した希薄な MC が、水分子を含む親水的な分子鎖をコロイド状に分散させるため、崩壊を防止していると考えられる。さらにこの親水基は接着効果を高める。しかしながら、33 以上では相転移によって分子鎖内の疎水性が強まるため、MC では分子鎖内の水分子を保持できず、崩壊に達すると考えられる。これより安定性が向上したのは、高温領域で MC が親水基を形成するためであると考えられる。

以上より 33 未満では安定的なハイドロゲル構造を作製することができた。33 以上では崩壊現象が発生するが、本研究ではアセンブリ用細胞として Sf9 を用いることとアラビアガムの緩やかな毒性のためにハイドロゲル中で培養しないことから、この崩壊を考慮する必要はない。

(3)安定化ハイドロゲルによる細胞アセンブリと培養

0.01g/mL GA-0.005g/mL MC 混合培養ハイドロゲルを用いて、図 2 と同様な 5mm 正方形の細胞アセンブリを実施し、操作終了後 30 程度に保温した培地を重層した。ここで、コンタミネーション防止のため、ハイドロゲル、重層培地に抗生物質としてペニシリン-ストレプトマイシンを推奨濃度で混合した。作製後、ハイドロゲル溶解過程、溶解後の位相差顕微鏡像を図 5、図 6、図 7 に示す。図 5 より高精度かつ安定的なパターンが可能であることが確認できる。また、図 6 より溶解するハイドロゲルの流動によって細胞は僅かに拡散するが、図 7 よりディッシュ全体に拡散することはなくアセンブリパターンを保

持っていることが確認できる。さらに、アセンブリ終了後の細胞の生存を確認できることから、安定化ハイドロゲルによって生きた細胞のダイレクトアセンブリが可能であることが確認された。次に作製した直線、曲線構造を図8に示す。これより、体積、接着面積が少ない微細構造も作製可能であることが確認された。

続いて、アセンブリされた5mm正方形細胞パターンの培養を行なった。培養五日目までの位相差顕微鏡像を図9に示す。これより、細胞がパターンを保持していないことが確認できる。これは、本実験でディッシュとして使用したアクリル板は表面処理されていないため細胞が浮遊状態となっており、僅かな外部振動で拡散してしまうためである。次に細胞の増殖に関して、アセンブリ直後から二日目までは多くの細胞の生存が確認できるが、培養二日目以降になると細胞の死滅が確認でき、培養五日目には生存している細胞も見られるが多くの細胞が死滅する。この原因は、重層培地量に対して細胞密度が希薄なためと考えられる。本研究で使用したアセンブリ用細胞 Sf9 は、細胞密度が十分でないと増殖せず死滅する特性を持つ。よって、アセンブリ細胞が増殖しない原因は Sf9 の特性にあるといえる。



図5 細胞混合安定化ハイドロゲルによるパターン

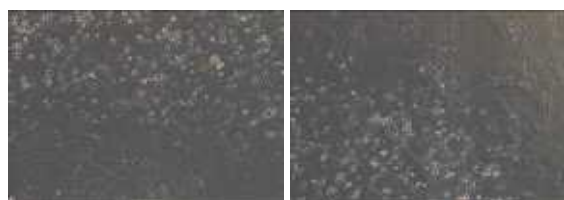


図6 安定化ハイドロゲルの溶解後の細胞配列状態



図7 細胞混合ハイドロゲルの溶解過程



図8 各種の細胞混合ハイドロゲルパターン

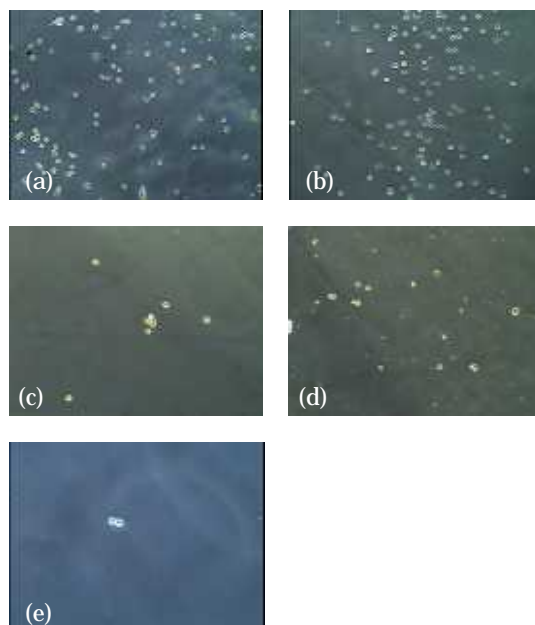


図9 配列された培養細胞：(a)配列直後、(b)2日後、(c)3日後、(d)3日後、(e)4日後、(d)5日後

(4)まとめ

本研究では、RPの押し出し法と液体スプレーにより発生するミストを利用することで、ダイレクトに細胞アセンブリする手法を提案した。培養ハイドロゲルを微細なマイクロピペットから射出することで、ミスト発生下でもプログラム上で設計した任意のハイドロゲル構造をディッシュ上に作製可能であることが明らかになった。しかしながら、液中ではハイドロゲルの物性が引き起こす構造の剥離や崩壊が発生する。そこで、GA,MCによる化学修飾によってハイドロゲルの安定化を図った。この結果、33以下の範囲では著しく安定性が向上した。安定化ハイドロゲルを用いて細胞アセンブリを実施した結果、作製されたパターンは培地中で安定であり、冷却によってハイドロゲルは速やかに溶解した。溶解の流動によって細胞は僅かに拡散するが、PC上でのデザインと同様な生きた細胞のパターンを得る事ができ、本研究の組織工学、再生医療への有効性を示す結果が得られた。

今後の展望としては、重層培地量の減少、

低密度培養用培地，接着系細胞の導入，さらに表面処理済のディッシュの利用によって，アセンブリ細胞の培養が可能と考えられる．また，高温領域で安定かつ細胞毒性を持たないハイドロゲルを導入することで，ゲル内でアセンブリ細胞が培養可能になると考えられる．

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3件)

Xiang Yu, Yukihiro Araki, Kentaro Iwami and Norihiro Umeda, Measurement of nanoparticle sizes by conventional optical microscopy with standing evanescent field illumination, Opt. Lett., 33, 23, 2794-2796(2008) 査読有

Xiang Yu and Norihiro Umeda, Shifting Standing Evanescent Wave phase with a Geometric Phase Shifter, Applied Physics Express, 1, 72502, 072502-1-072502-3 (2008) 査読有

I Nishiyama, N Yoshida, Y Otani and N Umeda, Single-shot birefringence measurement using radial polarizer fabricated by direct atomic force microscope stroking method, Meas. Sci. Technol., 18, 6, 1673-1677(2007) 査読有

[学会発表](計3件)

Kentaro IWAMI, Tomohide NODA, Kentaro ISHIDA, Keisuke MORISHIMA, Makoto NAKAMURA, Norihiro UMEDA, Rapid Prototyping of Cell Patterning by Injecting/Aspirating/Refilling

Thermoreversible Hydrogel, Bioprinting and Biofabrication in Bordeaux 2009, 2009年7月6日, Bordeaux, France

Xiang Yu, Yukihiro Araki, and Norihiro Umeda, Measurement of nano-particle size by evanescent interference field with conventional optical microscope, The 5th International Symposium on Instrument Science and Technology, 2008/09, China

野田知秀、石田謙太郎、森島圭祐、梅田倫弘、中村真人、感温性ジェルによるマイクロピペット細胞アセンブリ技術の開発、レーザー顕微鏡研究会、2007年6月27日、埼玉、

和光

[図書](計1件)

梅田倫弘(監修:渡邊敏行、魚津吉弘) 光学材料の屈折率制御技術の最前線、シーエムシー出版(2009) 273-284

[その他]

ホームページ

<http://www.tuat.ac.jp/umedalab>

6．研究組織

(1)研究代表者

梅田 倫弘 (UMEDA NORIHIRO)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・教授

研究者番号：60111803

(2)研究分担者

森島圭祐 (MORISHIMA KEISUKE)

東京農工大学・大学院共生科学技術研究院・准教授

研究者番号：60359114

(3)連携研究者

なし