

機関番号：12501
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21800009
 研究課題名（和文） 微小空間における水性多相溶液系を用いた細胞埋包非球形ハイドロゲルマテリアルの作製
 研究課題名（英文） Preparation of Non-spherical Cell-containing Hydrogel Materials Using Microscale Aqueous Multi-phase Systems
 研究代表者
 山田 真澄（YAMADA MASUMI）
 千葉大学・大学院工学研究科・特任准教授
 研究者番号：30546784

研究成果の概要（和文）：マイクロ流体デバイスを作製し、その中に複数の水溶液を連続的に導入することで、非球形のハイドロゲル材料を作製する新規手法の開発を行った。具体的には、主にアルギン酸を材料として使い、断面が組成の異なる複数の成分からなる異方的ハイドロゲルファイバーや、比表面積の大きい糸玉状のハイドロゲル粒子を作製する手法の開発に成功した。また作製したハイドロゲル材料の応用として、細胞の成長方向の制御や、高密度細胞培養を行い、その有用性を実証した。

研究成果の概要（英文）：Microfluidic techniques have been developed to prepare non-spherical hydrogel materials utilizing multiphase laminar flows inside microchannels. By mainly using alginate as the hydrogel substrate, we fabricated anisotropic hydrogel fibers with the cross section composed of multiple regions of different compositions, and non-spherical yarn-ball-shape hydrogel beads having a large surface-to-volume ratio. As applications, we successfully performed the guided cell growth and high-density cell cultivation, demonstrating the usefulness of the presented hydrogel materials.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,080,000	324,000	1,404,000
2010年度	980,000	294,000	1,274,000
総計	2,060,000	618,000	2,678,000

研究分野：

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：マイクロ・ナノデバイス バイオマテリアル ハイドロゲル 細胞移植

1. 研究開始当初の背景

近年、ES細胞あるいはiPS細胞研究分野の急速な発展とともに、それらを利用した再生医療への期待が高まっている。個々の細胞から立体的な組織・臓器を作製するための様々な組織工学的手法が開発されているが、現時点では3次元的な血管網を有し実際の臓器に代替可能な組織を作製するまでには至っていない。そのため、ある程度分化した個々の細胞や細胞塊を患部の臓器に直接注入する細胞移植は当面有効な手段であり、実

際I型糖尿病治療のための肝臓への膵島細胞移植のように、積極的に行われている例もある。しかしながら、通常の細胞移植においては移植する細胞（塊）の大きさ・形状にばらつきがあるため、たとえば膵島移植においては、生着率が10~20%と低く、複数回の移植を必要とする、という問題点があった。また、細胞塊が毛細血管を閉塞することで血流が阻害される可能性があるため、臓器の機能回復に必要な大量の細胞を一度に移植するこ

とは困難であった。そのため、大きさが均一で、かつ移植時に血流を阻害しない非球形の微小細胞塊を調製する技術は、細胞移植において非常に重要であると考えられる一方で、そのような研究例は、研究開始時点ではほとんど報告されていなかった。

一方、半導体微細加工プロセスを応用して作製したマイクロ・ナノ流体デバイス、あるいはマイクロバイオシステムと呼ばれる微小生化学反応・分離場に関する研究が、ここ数年盛り上がりを見せている。これらの微小デバイスは、単一細胞もしくは単一細菌とほぼ同等の大きさの微細な空間を任意に設計・作製できる、という特徴を有している。そして、このような微小空間に液体を連続的に導入すると、重力や慣性力に対する界面・表面張力の優位性により、流れは完全な層流を保つため、流れのプロファイルは流路の形状によって任意に制御できる。このようなマイクロフルイディクス（微小流体力学）という新しい概念の出現により、今までにないバイオプロセスの構築が可能になると期待されている。

そして最近、マイクロフルイディクスを利用することで、マイクロメートルサイズの微小材料を精密に作製・合成する手法が報告されるようになってきた。たとえば、通常の加工法では直径1ミリメートル以下のアルギン酸 **Ca** ビーズを作製することは困難であるが、カルシウムナノ粒子の利用とその溶解制御による、マイクロ流路内での直径100ミクロン程度の球形アルギン酸 **Ca** ゲルビーズの作製 (Takeuchi, *Adv. Mater.*, 2007) や、マイクロノズル・アレイを利用した直径100ミクロン程度のチューブ状ハイドロゲルの作製 (Sugiura, *Lab Chip*, 2008) など、細胞を埋包した単分散球形ハイドロゲル粒子を作製するための画期的な手法が提案されてきた。そして、マイクロフルイディクスを利用することで、これまでに報告されている球形やチューブ状の材料ではなく、非球形やリボン状の微小なハイドロゲル材料の作製が可能となれば、細胞移植において血流を阻害せず、かつ生着率を高く保つための新規な移植用細胞キャリアとして利用できる可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、マイクロフルイディク

スや微細加工技術を利用することで、非球形あるいは複合型のハイドロゲル材料を簡便かつ正確に作製するための新規手法の開発を目指した。そのために着目した系が、水性多相分配系と呼ばれる、2種類以上のポリマーあるいは塩を含む溶液が自発的に上下層に分配する水溶液系である。この多相の水溶液系を利用し、まず(1)細胞を埋包した非球形(半球状・円盤状・C字型など)なゲル粒子を作製する手法と、(2)矩形の断面を有するリボン状のハイドロゲル材料を作製する手法、の2つの系の開発を目指した。また、以上に加えて(3)微細加工を施したハイドロゲル基材の作製を行った。さらに、それぞれの材料に対し、細胞を内包する、あるいは表面に播種することで、細胞培養あるいは細胞移植のための担体としての利用を試みた。

3. 研究の方法

(1) 非球形ハイドロゲル粒子の作製

細胞を埋包した非球形アルギン酸ハイドロゲル粒子を作製するために、まず水性多相分配系と呼ばれる、2種類以上のポリマーあるいは塩を含む溶液が自発的に上下層に分配する水溶液系に着目した。この2相溶液系によって構成される液滴を流路内で作製し、液滴中の一方の相のみをゲル化することで、非球形ハイドロゲル粒子の作製が可能であるか検討を行った。

また、別の手法として、マイクロ流路内で形成した層流系を用い、ファイバー状のアルギン酸ゲルを部分的に切断し液滴中に閉じ込めることによって、糸玉状のハイドロゲル粒子を作製する手法の開発を行った。4~7本の入口流路を有し、それらが途中合流するマイクロ流路構造を設計・作製し、その中央部の入り口からアルギン酸 **Na** 溶液を、その外側にバッファー溶液、ゲル化剤 (Ca^{2+} イオンを含む) 溶液、さらに油相をそれぞれ連続的に導入することで、ファイバーが完全にゲル化する直前に切断することを試みた。また糸玉状ハイドロゲル材料に関しては、動物細胞を内包しその成長の様子を観察した。

(2) 複合型アルギン酸ハイドロゲルファイバーの作製と応用

具体的には、下図1に示す多分岐合流型微小

流体デバイスを利用することで、並行層流系を形成し、ゲル化剤を物質拡散によって徐々にゲル分子含有相に移行させることで、断面が矩形であるリボン状ハイドロゲルの作製を目指した。ハイドロゲル材料としてはアルギン酸、あるいはアルギン酸とコラーゲンの混合溶液を用い、それらを中央の入口から連続的に導入しつつ、周囲から増粘剤を含むバッファー溶液およびゲル化剤溶液を導入することでゲル化し、ファイバー状のハイドロゲル材料を得た。さらに内部に細胞を埋包することによって、細胞培養担体としての応用を試みた。

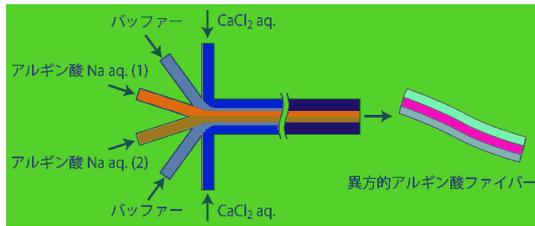


図 1 複合型アルギン酸ハイドロゲルファイバー作製のための流路構造模式図。

(3) 微細加工を施したハイドロゲル基材の作製

生体構造を高度に模倣した比較的大きな三次元的組織を作製するためには、表面や内部に微細構造や流路構造ネットワークが形成された基材を作製する必要がある。これまでにハイドロゲルを材料とした微細加工培養基材の作製が多数報告されている。本研究では、アルギン酸ナトリウム (NaA) に対し、 Ca^{2+} 存在下でもゲル化しないアルギン酸誘導体であるアルギン酸プロピレングリコール (PGA) を一定割合混合することで、ゲル化時の体積収縮を抑制し、微細構造を有するアルギン酸 Ca ハイドロゲルをモールドイングによって簡便に作製する手法を提案した。実験では、リソグラフィーによって作製した鋳型の上に NaA-PGA 水溶液を注ぎ、続いて 0.1 M CaCl_2 水溶液を静かに注ぎ、アルギン酸をゲル化させ、微細構造を持つアルギン酸 Ca ゲルプレートを得た。流路構造の作製を試みたほか、応用として細胞集塊の形成を行った。

4. 研究成果

(1) 非球形ハイドロゲル粒子の作製

ハイドロゲルの材料として主にアルギン酸 Ca を用い、非球形ハイドロゲル粒子の作

製を試みた。複数の入口構造を有する PDMS マイクロ流体デバイスを作製し、水性 2 相溶液系の作製を行ったところ、非球形ハイドロゲル粒子の作製では、(1) 平衡状態にある 2 相溶液系ではなく、非平衡状態の溶液系を用い、(2) 非ゲル化部として高分子量の PEG を用い、(3) さらに流路表面にアルキルシラン化処理を行った場合に、直径 $100\sim 200$ ミクロン程度の、C 字型の非球形アルギン酸ハイドロゲルを作製できることが確認できた。また、ゲル化部と非ゲル化部の流量を調節することで、C 字のくびれ部分の形状をコントロールすることが可能であった。しかしながら、大きさに 30% 程度のばらつきがあり、また、比表面積の値に限界があった。

そこで次に、直線状ハイドロゲル材料を部分的にゲル化した時点で断片化し、液滴中に折りたたむことによって毛糸玉状のハイドロゲル粒子を作製する新規手法を提案した。図 1 に示した流路構造と類似の構造を用い、中心側からアルギン酸溶液、外側から CaCl_2 水溶液、さらにその外側からオリーブ油を導入し、 CaCl_2 濃度を変化させて実験を行ったところ、 CaCl_2 濃度が低い場合には、アルギン酸のゲル化速度が遅すぎるために液滴内の溶液が混合し、内部に空隙のない球状のゲル粒子が得られ、また、 CaCl_2 濃度が高い場合には、ゲル化速度が速すぎるためにファイバーが完全にゲル化してしまい、切断されなかった。一方、 CaCl_2 濃度を最適化することにより (たとえば 10 mM)、液滴形成流路において液滴が形成され、ファイバーが切断されたのち液滴内に閉じ込められ (図 2 a)、実際に毛糸玉状ハイドロゲル粒子が得られることが確認された (図 2 b)。さらに、毛糸玉状ハイドロゲル粒子のファイバー内において NIH-3T3, HeLa 等の細胞を培養したところ増殖が確認され、培養担体としての適用可能性を示すことができた。毛糸玉状のアルギン酸ハイドロゲル粒子を合成するためのマイクロ流路を用いた手法を開発した。本研究で得られた毛糸玉状ハイドロゲル粒子は、細胞移植用のキャリアとしてのみならず、組織工学やバイオ生産プロセスにおける培養担体として有用であると期待される。

(2) 複合型アルギン酸ハイドロゲルファイバーの作製と応用

ファイバー状ハイドロゲルを作製する場

合には、デキストランを増粘剤として用いることで、直径数ミクロン～200 ミクロン程度のファイバー状アルギン酸 Ca ゲルを安定的に作製することに成功した。なお、作製されたファイバーの断面形状は、縦横比が 1:1～1:1.5 程度の矩形であった。このファイバー状ゲルの作製において、複数の入口から組成の異なる溶液を導入することによって、左右で異なる組成（強度）のゲルを作製すると、らせん状のマテリアルが得られること、さらに油相を導入することで液滴を内包するファイバーの作製が可能であることなどを見出した（下図 2）。また、断面の一部が強度の異なる（柔らかい）ファイバーの内部において細胞培養を行うと、細胞はファイバーの柔らかい部分に沿って長さ方向に細長いコロニーを形成しつつ増殖することが確認できた。さらに、神経様細胞を物理的に異方的なファイバーの内部に埋包した場合、神経突起の伸長方向を制御することも可能であった。このような異方的な水ゲルファイバーは、線形の組織構築を行うための新しいツールとなり得るほか、3 次元的組織構築におけるパーツとして有用であると考えられる。

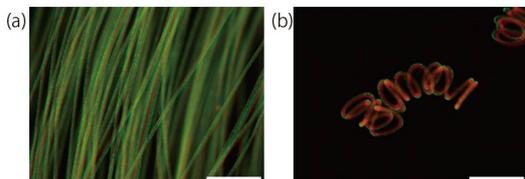


図 2 作製した複合型アルギン酸水ゲルファイバーの例。(a) 直線状ファイバー (b) らせん状ファイバー。

(3) 微細加工を施した水ゲル基材の作製

NaA 濃度を 1% に固定し、PGA の混合割合を変化させ、CaCl₂ 水溶液によるゲル化時の体積収縮率を測定したところ、PGA 濃度が 2.5% 以上の場合に収縮率が低く（約 20%）、鋳型を利用した微小構造を有するゲル基材の作製が可能であった。微細加工によって作製した鋳型を用いることで、数十マイクロメートル程度の凹凸構造を有するゲル基材を作製した。また、細胞培養への応用として、直径 100～300 μm、深さ 300 μm の円柱状ウェル構造を持つ水ゲルを作製し、スフェロイド形成を試みた。ウェル構造上にラッ

ト初代肝細胞を播種し、一定時間後にゲル上面を洗浄し余分な細胞を取り除いたところ、一定量の肝細胞がウェル内にトラップされる様子が観察された。その後培養を行ったところ、細胞はアルギン酸ゲル表面に付着しにくいためスフェロイドを形成し、そのサイズはウェルのサイズに依存することが確認された。本手法によって作製が可能となった微細構造を有するアルギン酸水ゲル材料は、立体的な組織構築やゲル表面の微細構造を利用した細胞培養を行う上で有用であると考えられる。

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）

〔学会発表〕（計 10 件）

- ① 山田絵海, 山田真澄, 菅谷紗里, 関 実, 「マイクロモルディングを利用したパターン化水ゲル材料の作製と応用」 化学工学会第 76 年会 2011 年 3 月 22 日 東京農工大学（中止により要旨集配布のみ）
- ② 三山文葵, 山田真澄, 菅谷紗里, 関 実, 「マイクロ流路を用いた毛糸玉状水ゲル粒子の合成と細胞培養担体としての応用」 化学工学会第 76 年会 2011 年 3 月 22 日 東京農工大学（中止により要旨集配布のみ）
- ③ 山田真澄, 「水力学的手法を利用したマイクロ細胞操作システムの開発」 第 30 回キャピラリー電気泳動シンポジウム（招待講演） 2010 年 11 月 長良川国際会議場
- ④ 山田真澄, 長沼洋次, 菅谷紗里, 関 実 「マイクロ流路を用いた異方的アルギン酸ファイバーの作製と細胞の成長方向制御」 第 62 回 日本生物工学会大会 2010 年 10 月 宮崎シーガイア
- ⑤ 山田真澄, 「マイクロフルイディクスを応用した細胞選抜・処理・培養テクノロジー」 学振 151 委員会（招待講演） 2010 年 7 月 早稲田大学理工学部
- ⑥ 山田真澄, 菅谷紗里, 関 実, 「マイクロ流路を用いた複合型アルギン酸水ゲルファイバーの作製とその応用」 第 21 回化学とマイクロ・ナノシステム研究会 2010 年 6 月 東大本郷キャンパス
- ⑦ 菅谷紗里, 山田真澄, 関 実, 「マイクロ流体デバイスを用いた異方的水ゲルファイバーの作製と細胞共培養系への応用」 化学工学会 第 75 年会 2010 年 3 月 鹿児島大学
- ⑧ Yoji Naganuma, Sari Sugaya, Masumi Yamada, and Minoru Seki, “Anisotropic Alginate Hydrogel Fibers for Controlling

the Direction of Cell Growth” , The 16th Symposium of Young Asian Biochemical Engineers' Community (YABEC 2010), Yuan Ze University, Taoyuan, Taiwan, Nov. 20-22, 2010.

⑨Masumi Yamada, Sari Sugaya, and Minoru Seki, “Microfluidic Synthesis of Complex Alginate Fibers for the Direction Control of Cell Growth” , 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (mTAS2010), Groningen, The Netherlands, Oct. 3-7, 2010.

⑩Masumi Yamada, Sari Sugaya, and Minoru Seki, “Microfluidic Fabrication of Anisotropic Alginate Fibers for Controlling the Local Cellular Environment” , 6th Sweden-Japan Workshop on BioNano Technology, Mishima, May 10-13, 2010.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

名称：ハイドロゲル基材の作製方法および細胞集塊の形成方法

発明者：関 実, 山田真澄, 山田絵海

権利者：千葉大学

種類：特許出願

番号：2011-035262

出願年月日：2011 年 2 月 21 日

国内外の別：国内

名称：非球形ハイドロゲル粒子の合成法及び非球形ハイドロゲル粒子

発明者：関 実, 山田真澄, 三山文葵

権利者：千葉大学

種類：特許出願

番号：2011-034026

出願年月日：2011 年 2 月 18 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 真澄 (YAMADA MASUMI)

千葉大学・大学院工学研究科・特任准教授

研究者番号：30546784