

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：33919

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23106006

研究課題名（和文）ナノスケール超高速細胞選別・操作に基づく3次元細胞システムの超高速アセンブリ

研究課題名（英文）High Speed Assembly of 3D Cell System based on Nano-scale Cell Manipulation

研究代表者

福田 敏男（Fukuda, Toshio）

名城大学・理工学部・教授

研究者番号：70156785

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 99,500,000円

研究成果の概要（和文）：マイクロチップ内での細胞操作技術を発展させ、細胞をハイドロゲルなどのマイクロ構造体中に閉じ込めることで、連続的に細胞をアセンブリする技術を提案した。また、磁性などを利用することで、マイクロ構造体中に閉じ込めた細胞を一括してアセンブリすることで、3次元細胞システムの超高速アセンブリ技術を提案した。さらに、局所環境計測・制御用デバイス技術を応用し、環境制御型電子顕微鏡内でのナノマニピュレーション技術を発展させ、3次元かつ局所的な細胞操作システムを構築した。

研究成果の概要（英文）：To achieve 3D cell system, sequential cell assembly techniques were proposed by a micro-chip device using micro structures encapsulated cells. Magnetic assembly techniques were investigated by encapsulating cells with magnetic particles in micro structures. The local cell manipulation system was constructed using local environmental control devices based on nanomanipulation system inside environmental scanning electron microscope.

研究分野：メカトロニクス，ロボット工学，マイクロ・ナノシステム工学

キーワード：細胞操作 3次元細胞システム 細胞アセンブリ 局所環境計測・制御 マイクロ構造体

1. 研究開始当初の背景

近年、生命システムの最小機能単位である細胞における局所環境の解析や制御について研究が活発であり、再生医療などを目指し3次元組織構築に対して注目が集まっている。

我々はこれまでマイクロチップやマイクロ・ナノピペットによる局所環境計測・制御技術や、ナノツールを用いて単一細胞の物理化学特性を低侵襲に計測・操作するといった新規バイオ環境制御システムを世界に先駆けて構築してきた。特に、ナノマニピュレーション技術によりナノツールをマイクロメートルサイズの細胞に対して応用し、これまで不可能であった局所的な細胞計測を行ってきた。また、マイクロメートル精度で患者の血管構造を模擬した血管内手術シミュレータ“EVE (Endovascular Evaluator)”を提案し、血管内治療に関わる医療技術の評価やテーラーメイド人工血管足場への応用について取り組んできた。

2. 研究の目的

本研究では、マイクロチップ内での細胞操作技術を発展させ、細胞をハイドロゲルなどのマイクロ構造体中に閉じ込めることで、連続的に細胞をアセンブリする技術を実現する。また、磁性などを利用することで、マイクロ構造体中に閉じ込めた細胞を一括してアセンブリすることで、3次元細胞システムの超高速アセンブリ技術の確立を目指す。さらに、局所環境計測・制御用デバイス技術を応用し、環境制御型電子顕微鏡内でのナノマニピュレーション技術を発展させ、3次元細胞システムの機能解明のための局所細胞操作システムを構築する。

3. 研究の方法

本研究で提案した主な研究方法について述べる。

1) マルチ機能を統合化したマイクロ流体チップによる細胞アセンブリ

マルチ機能を統合化したマイクロ流体チップを提案し、3次元の細胞構造体作製へ応用した。図1にマルチ機能を統合化したマイクロ流体チップの細胞構造体作製への応用のコンセプトを示す。この実現のため、主に、下記の4つの課題に取り組んだ。

第1に、細胞を操作する手法が必要である。このため、オンチップで光硬化性樹脂を任意形状に加工する技術を応用しマイクロ流体チップ中にマイクロツールを導入した。このマイクロツールは、光ピンセットなどの方法により駆動することができ、細胞と同等の非常に小型のマイクロツールを実現した。

第2に、細胞を一括して操作するために、マイクロ構造体に固定する手法が必要である。細胞は、生体組織を構成するにあたり、微細かつ複雑なパターンを有している。我々は、誘電泳動(Dielectrophoresis, DEP)を用いて、細胞をパターンニングする技術を応用

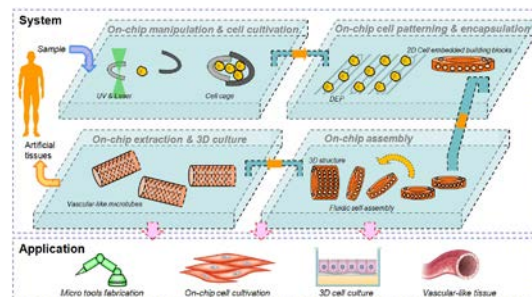


図1 マルチ機能を統合化したマイクロ流体チップの細胞構造体作製への応用

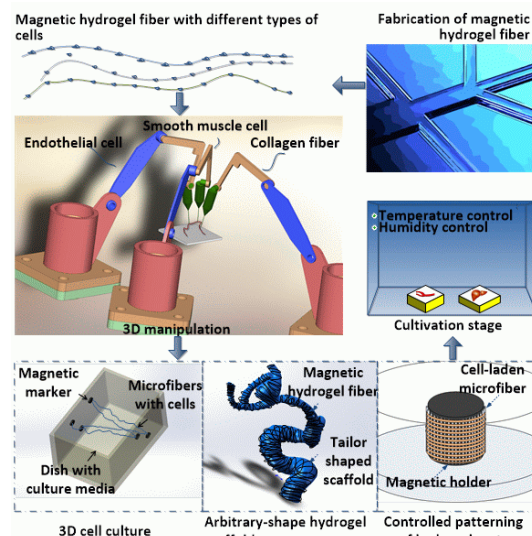


図2 細胞及び磁性微粒子を含むゲルファイバを用いた磁場操作による3次元細胞アセンブリ

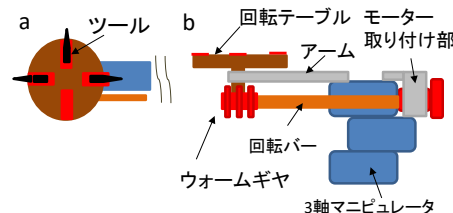


図3 ツールフィーディングシステム (a) 上面図 (b) 側面図

した。また、パターンニングした細胞の形状を保つために、光硬化性樹脂中に包埋する方法を提案した。これにより、様々な形状のマイクロ細胞構造体を作製した。

第3に、作製したマイクロ細胞構造体を3次元構造体に組み立てる手法が必要である。我々は、オンチップで流体を用いて、作製した2次元細胞構造体を自己組織的に組み立てる手法を提案した。これにより、管状の3次元細胞構造体の組み立てへ応用した。

第4に、組み立てた3次元細胞構造体をマイクロチップから取り出す手法である。我々は、マイクロバルブを組み込んだマイクロ流体チップにより、3次元細胞構造体を取り出す手法を提案した。

2) 磁場操作に基づいた細胞アセンブリ

ハイドロゲルファイバを用いることで、各種細胞を閉じ込めて、3次元的に組み上げる手法を提案した。この際、ゲルファイバ中に

磁性微粒子を包埋することで、外部磁場によりゲルファイバを操作した。我々は、磁気ピンセットを用いて、磁性微粒子を含むゲルファイバを3次元的に操作するシステムを構築した(図2)。ゲルファイバ中の細胞の濃度及び磁性微粒子の濃度を調整することにより、磁気操作時に十分な磁力が得られるとともに、細胞の成長を阻害しないゲルファイバを得る必要がある。このため、オンチップで細胞と磁性微粒子を含むゲルファイバを作製した。また予め磁石を配置しておくことで、磁力を利用して磁性ゲルファイバを容易に3次元空間に固定する手法を提案した。固定したゲルファイバを溶解し、細胞培養することで、3次元細胞構造体を得ることが出来る。

3) ツールフィーディングシステムによるナノマニピュレーションの効率化

微細な作業を実現するマイクロ・ナノマニピュレーションは、生体物質や細胞を扱うバイオ分野を中心として応用が進んでいる。我々は、環境制御型電子顕微鏡(Environmental Scanning Electron Microscope, E-SEM)内でのナノマニピュレーションシステムにより、湿潤状態の生物試料に対して、複数のナノツールを用いたナノサージェリーシステムを提案してきた。この際、各ナノツールを手作業で交換すると交換作業に手間と時間を要することが問題であった(試料室を大気開放し、再度、減圧するために15分~2時間程度が必要である。)

そこで本研究では複数のマイクロ・ナノツールを連続的に使用可能とし、ナノマニピュレーションを効率化するためのツールフィーディングシステムを提案した。我々が提案した、回転テーブル式ツールフィーディングシステム(Rotary Tool Feeding System, RTFS)の構成を図3に示す。RTFSは①回転テーブル②アーム③モータ取り付け部④回転バーの4つの部品から構成される。まず予め複数のナノツールを回転テーブルに取り付けておく。回転テーブルが回転することで使用するマイクロ・ナノツールを交換する。電子顕微鏡内に組み込むため、コンパクトな機構が必要であるので、ウォームギヤを先端部に用いることで、モータの回転をテーブルの回転に変換する機構とした。

#### 4. 研究成果

本研究で提案した主な研究成果について述べる。

##### 1) マルチ機能を統合化したマイクロ流体チップによる細胞アセンブリ

我々が提案した、オンチップ加工法により、マスク形状に基づいた様々な形状のマイクロ構造体中に、細胞を包埋することが出来た。例えば、ドーナツ形状の細胞構造体を作製している様子を図4に示す。

このマイクロ細胞構造体は、マイクロ流体チップ中で流体力により搬送が可能である。そこで、マイクロ細胞構造体がマイクロウエ

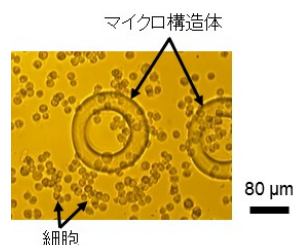


図4 培養細胞を包埋したマイクロ構造体の作製結果

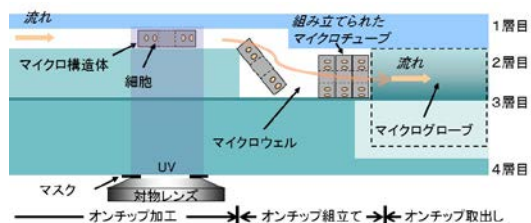


図5 4層のからなるマイクロ流体デバイスを用いたマイクロ構造体の作製と組み立ての模式図



図6 マイクロチューブ(直径190 μm)の組立て結果

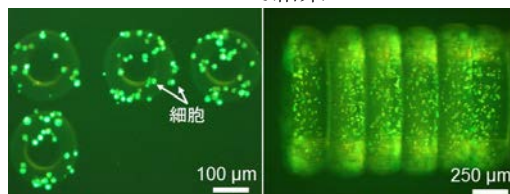


図7 マイクロチューブ構造体内の細胞観察(緑色が生細胞を示す)

ルと呼ぶマイクロチップ中の空間に入る際、流れ方向に沿って90度回転するように流体デバイスを設計した。これにより、マイクロ構造体を順次マイクロウェルへ配列し、積層化する手法を提案した。

この手法を実現するため、図5に示す4層からなるPDMSマイクロ流体デバイスを作製した。第1層目はマイクロ構造体をオンチップ作製するためのスペースである。第2層目はマイクロ構造体を組み立てるためのマイクロウェルである。第3層目は薄いPDMS薄膜と、マイクロウェルに流れてきたマイクロ構造体を堰き止めるためのストッパーである。ストッパーには細い溝があり、流体は流れるがマイクロ構造体は堰き止めることができる。第4層目は負圧によって第3層目の薄膜を変形させ、ストッパーを第4層目へと落ち込ませることで、マイクロウェルで組み立てたマイクロチューブをデバイス外部に取り出すことができる。この機構は常閉型バ

ルブと呼び、負圧を印加しない際は、ストッパーが作動する機構である。

提案したマイクロ流体デバイスを用いて、マイクロ構造体の自己組織的組み立てを行った。その一例を図6に示す。マイクロ構造体をオンチップ作製手法により作製し、流路出口からシリンジポンプを用いて流体を吸引することで、マイクロ構造体をマイクロウェルへと運び、自己組織的に配列し組み立てた。この場合、18秒間で9個のドーナツ型マイクロ構造体を積層し、マイクロチューブに組み立てた。そして、先に述べた常閉型バルブを開放することにより、組み立てたマイクロチューブ構造体をデバイスから取り出すことに成功した。

以上により、図7に示すように、細胞が生存した状態で、マイクロチューブ細胞構造体を作製することに成功した。

## 2) 磁場操作に基づいた細胞アセンブリ

小口径細胞構造体の作製技術として、ゲルファイバ巻き取りシステム (Gel-Fiber Reeling System, Gel-FRS) を提案した。そのコンセプトを図8に示す。本装置は、小口径の人工血管形状を有する生分解性 (poly(L-lactide-co-ε-caprolactone), PLCL) 足場に、細胞を包埋したゲルファイバを巻き取ることで細胞を播種するために用いた。作製した hidroゲルファイバ中の細胞の生存率を確認するために、Live/Dead 染色により細胞を蛍光染色し、倒立顕微鏡で生細胞と死細胞を蛍光観察した結果、細胞の生存率は90%以上であった (図9, 繊維芽細胞 NIH/3T3 細胞を利用)。

提案した手法により、PLCL材の人工血管足場に繊維芽細胞及び平滑筋細胞を播種した。細胞を含んだゲルファイバを足場に巻きつけた後、ゲルを溶解させ細胞を足場上に播種した。この際、足場上下面に均一に細胞を付着させるため、足場を一定時間間隔で回転させた。回転条件によって、足場の上面の細胞の剥がれが異なることが確認され、回転条件を1時間に設定することで、図10に示すように、足場の上面と下面の全体を細胞で覆うことが出来た。

また、磁性微粒子を含むゲルファイバを、マイクロ流体チップにより作製した。マイクロ流体チップを用いることで、ゲルファイバ中の磁性微粒子の位置・濃度を高精度に調整することが可能となる。このマイクロ流体チップの構成を図11に示す。磁性微粒子は、マイクロ液滴としてゲルファイバ中に包埋した。作製した磁性微粒子を含むゲルファイバを組み立て操作するため、磁気ピンセットを用いた。磁気ピンセットは、電磁石を用いて、磁性ゲルファイバに対する外力を調整することが可能である。ソレノイド型電磁石を用いた磁気ピンセットの実験装置を図12に示す。磁気ピンセットは、3次元の電動駆動ステージに取り付けられ、さらに磁気ピンセット先端部の角度を調整するためのクラン

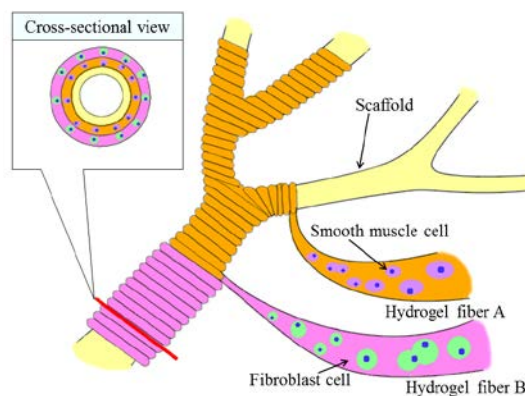


図8 細胞を包埋したゲルファイバ巻き取りによる細胞足場上への細胞播種のコンセプト

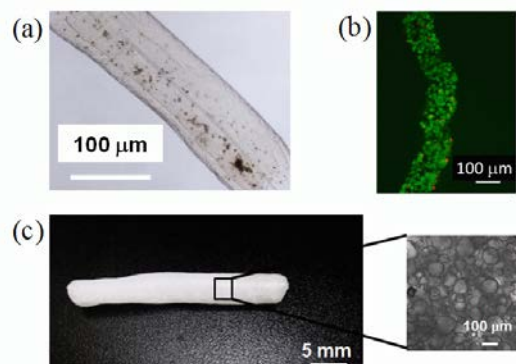


図9 細胞を包埋した hidroゲルファイバと小口径人工血管足場 (a) 細胞を包埋した hidroゲルファイバの明視野像 (NIH/3T3 細胞) (b) 細胞を包埋した細胞の Live/Dead 蛍光染色結果 (NIH/3T3 細胞) (c) 生分解性の PLCL 細胞足場の写真と顕微鏡像

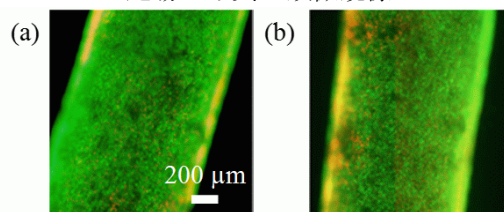


図10 回転条件による細胞足場上への細胞の接着性評価実験結果 (a) 上面 (b) 下面

機構と駆動用モータにより、磁気ピンセット先端の位置及び角度を調整可能である。磁場を集中させるために鋭端形状とした。実験の結果、0.2 A の電流を印加することで、30 mT の磁場が発生し、液中で磁性ゲルファイバを操作するために十分な磁力が得られた。実際に磁性ゲルファイバをマイクロピラーに巻き付けることでアセンブリした (図13)。マイクロピラーは、直径が0.7 mm であり、3 mm 間隔に配置した。0.035 T のネオジウム磁石をピラーの下側に配置することで、アセンブリした磁性ゲルファイバの位置決めを行った。3本のマイクロピラーやアレイ状にパターンニングしたマイクロピラー上の所望の位置にゲルファイバを巻き付け、位置を固定できることを示した。

## 3) ツールフィーディングシステムによるナ

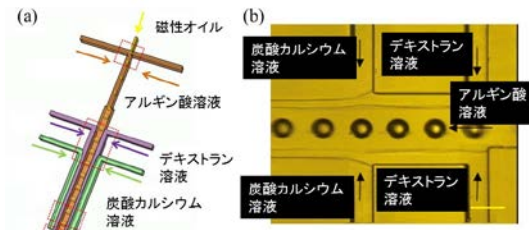


図 11 マイクロ流体チップによる磁性微粒子を含むゲルファイバの作製 (a) マイクロチップの構成図 (b) 作製中の顕微鏡写真

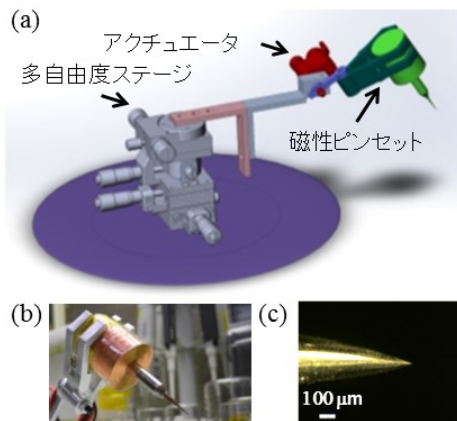


図 12 磁気ピンセット装置 (a) 全体模式図 (b) 電磁石部 (c) ピンセット先端部

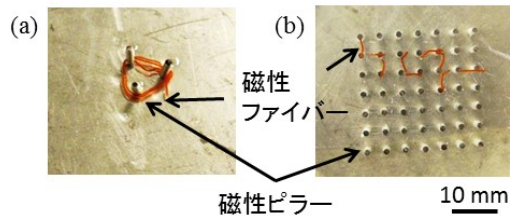


図 13 磁場操作による磁性微粒子を含むゲルファイバの組立て結果 (a) 3本のマイクロピラーへの組立て (b) アレイ状のマイクロピラーへの組立て

#### ノマニピュレーションの効率化

はじめに、図 3 で示した RTFS の動作評価を行った(図 14). RTFS のアクチュエータに単一パルスを与えることで、回転角度を  $0.002^\circ$ 、テーブルの端を約 200 nm で位置決めできた。また、RTFS の回転速度は、最大で約 1.15 rpm であり、約 13 秒で  $90^\circ$  間隔で設置したマイクロ・ナノツールを交換することが出来た。さらに我々は、E-SEM 内に SEM-CT 装置 (Scanning Electron Microscope-Computed Tomography, SEM-CT) を組み込むことで、3 次元的な試料観察を実現した。SEM-CT 装置は、電子顕微鏡の電子線を用いて X 線を発生させ、X 線透過像から試料の断層像を 400 nm 以下の高分解能かつ非破壊で観察することが可能である。

本装置を用いて、線虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*) を対象としたナノインジェクション操作を行った。図 15 に示すように、集束イオンビーム加工装置によりマイクロ・ナノインジェクタを作製した。先端部

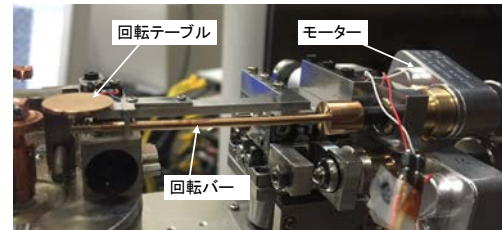


図 14 ツールフィーディングシステムの外観写真

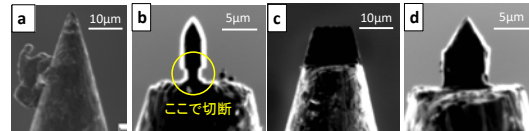


図 15 ナノインジェクタの作製結果

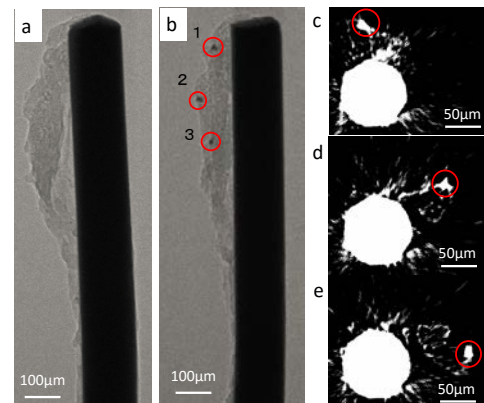


図 16 線虫へのナノインジェクタのマルチインジェクション実験後の SEM-CT 像

をインジェクションのために鋭利な形状に加工し、その根元部を細くする形状とした。構築したナノマニピュレーションシステムにより、インジェクション前、途中、後の電子顕微鏡画像を図 16 に示す。RTFS によりツールを交換することで、このインジェクション操作を 3 回連続で行い、SEM-CT 断層像によりナノツールを確認することが出来た。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 48 件, 代表的な論文として, 4 件のみ記載)

- [1] T. Yue, M. Nakajima, M. Takeuchi, C. Hu, Q. Huang, T. Fukuda, Lab on a Chip, Vol. 14, pp. 1151-1161, 2014. 査読有
- [2] C. Hu, M. Nakajima, M. Takeuchi, T. Yue, M. Seki, Q. Huang, T. Fukuda, Vol. 17, pp. 457-468, 2014. 査読有
- [3] M. Takeuchi, M. Nakajima, M. Kojima, T. Fukuda, J. of Micro-Bio Robotics, Vol. 8, pp 53-64, 2013. 査読有
- [4] M. R. Ahmad, M. Nakajima, M. Kojima, S. Kojima, M. Homma, T. Fukuda, IEEE Transactions on Nanobioscience, Vol. 11, pp. 70-78, 2012. 査読有

[国際学会発表] (計 125 件)

[受賞] (計 17 件)

- [1] 福田敏男, 紫綬褒章 (2015 年秋), 内閣府
- [2] T. Fukuda, IROS Distinguished Service Award, 2015 IEEE/RSJ Int. Conf. on Intelligent Robots and Systems (IROS2015), (2015)
- [3] 福田敏男, 日本機械学会技術功績賞, (2015)
- [4] H. Wang, Q. Shi, Q. Huang, T. Sun, M. Nakajima, M. Takeuchi, T. Fukuda, Best Student Paper Award, The 12th IEEE Int. Conf. on Information and Automation (ICIA2015), (2015)
- [5] T. Fukuda, Friendship Award of State Administration of Foreign Experts affairs of the P. R. C. (2014)
- [6] 竹内大, 市川 明彦, 中島正博, 福田敏男, 長谷川泰久, ベストプレゼンテーション賞, 第 15 回システムインテグレーション部門講演会 (SI2014), (2014)
- [7] 福田敏男, 産学官連携功労者表彰文部科学大臣賞, 文部科学大臣下村博文 (2013)
- [8] 福田敏男, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門 25 周年部門功労表彰 (2013)
- [9] 福田敏男, 日本知能情報ファジィ学会功績賞 (2013)
- [10] M. Nakajima, Early Career Award in Nanotechnology, The IEEE Nanotechnology Council, 2013
- [11] T. Yue, M. Nakajima, C. Hu, M. Takeuchi, T. Fukuda, Best Paper Award in 2013 Int. Symp. on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2013), (2013)
- [12] M. Nakajima, N. Nakanishi, N. Hisamoto, H. Tajima, M. Homma, T. Fukuda, Best Paper Award in 2012 Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2012), (2012)
- [13] S. Ikeda, T. Fukuda, Best Poster Award in 2012 Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2012), (2012)
- [14] T. Fukuda, Friendship Award of Liaoning Province, Liaoning Provincial People's Government, PR China (2012)
- [15] T. Fukuda, IROS Harashima Award for Innovative Technologies (2011)
- [16] Y. Shen, M. Nakajima, S. Kojima, M. Homma, T. Fukuda, ICRA2011 Best Manipulation Paper Award, (2011)
- [17] 福田敏男, 池田誠一, 日本機械学会技術賞, (2011)

[招待・基調講演] (計 44 件)

[社会貢献] (計 14 件)

- [1] 中部経済連合会 伊勢志摩サミットガイドブック「ものづくり最前線の“ロボット産業”」2016 年 3 月
- [2] 日経産業新聞「日本のイノベータ」, 2015 年 4 月
- [3] 中部経済新聞「研究現場発」, 2015 年 5 月
- [4] 公益財団法人富山県新世紀産業機構 産学官連携推進センター, 第 3 回「とやまロボット技術研究会」講演, 2015 年 3 月
- [5] 日経産業新聞「脳動脈瘤破裂防ぐ器具」2015 年 9 月
- [6] ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014「最近のマイクロナノロボット技術の進歩」, 2014 年 5 月
- [7] 持続可能な開発のための教育 (ESD) に関するユネスコ世界会議, Workshop: Accelerating Action for Sustainable Development (Energy), 2014 年 11 月
- [8] RSJ ヒューマンセントリックロボティクス研究専門委員会若手研究発表会, 「マルチスケールロボットシステムの研究」, 2014 年 1 月
- [9] 中部産業連盟新産業フォーラムセッション講演, 鉄腕アトムと知能ロボットへの夢, 2012 年 7 月
- [10] 独立行政法人科学技術振興機構主催サマーサイエンスキャンプ, マイクロ 2 足歩行ロボットの製作と制御, 2012 年 7 月
- [11] 人工知能研究振興財団発表講演会 講演, マルチスケールロボティクス, 2012 年 12 月
- [12] 人工知能研究振興財団第 3 回次世代ロボット研究者交流会 講演, 世界の次世代ロボット開発の最前線, 2011 年 3 月
- [13] 理化学研究所第 28 回マイクロ加工シンポジウム 講演, マイクロナノロボットマニピュレーションによるデバイス作成と操作, 2011 年 5 月
- [14] 独立行政法人科学技術振興機構主催サマーサイエンスキャンプ, マイクロ 2 足歩行ロボットの製作と制御, 2011 年 7 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

福田 敏男 (FUKUDA TOSHIO)  
名城大学・理工学部・教授  
研究者番号: 70156785

### (2) 研究分担者

中島 正博 (NAKAJIMA MASAHIRO)  
名古屋大学・工学研究科・助教  
研究者番号: 80377837