

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：17104

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14200

研究課題名(和文) 卵白の熱凝固特性を利用したin ovoマーカ形成と力センシングへの挑戦

研究課題名(英文) Development of in ovo microfabrication technique on the albumen part of chick embryo

研究代表者

川原 知洋(KAWAHARA, Tomohiro)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・准教授

研究者番号：20575162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高い現実感と訓練効果が得られる微細手術シミュレータの実現を目指し、ニワトリ胚を透明人工殻内で長期培養しながら、胚に加わった力を外部から計測する方法を確立することを目的とする。

本研究では、マイクロヒーターを用いてニワトリ胚を生かしたまま白身局所させてマーカを形成する技術を新たに開発し、力センシングへの応用可能性について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：We have proposed a novel platform which consists of a cubic artificial eggshell containing a chick embryo for effective simulation in microsurgical training. 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 a fabrication technique to make microobjects on the albumen part of living chick embryo by using a microheating tool.

研究分野：バイオメディカルロボティクス

キーワード：生体シミュレータ ニワトリ胚 マイクロツール

1. 研究開始当初の背景

脳外科等における微細手術では、直径 1 mm 以下の血管に対して顕微鏡を観察しながらバイパス手術等を実施するため“匠の技”が必要となる。医師からは手術トレーニングによる技術の底上げに加え、技量評価による安全性向上や手技の体系化が求められている。これに対して、人工血管（模擬臓器）や VR 技術を用いた手術訓練・評価装置が多数開発されているものの、実際は生体（動物）を用いた方法が最も現実感が高く、訓練効果も大きい。しかしながら、実験にかかるコストの問題に加え、近年では倫理的な制約によって世界的に大型動物（ブタやイヌ等）を用いた実験を実施するのが困難になっている。

当該研究代表者は代替動物として“たまご（ニワトリ胚）”に着目し、図 1 (a) のように機械工学的な観点から透明人工殻（フレーム構造 + 酸素透過膜）を設計し、開発した人工殻に移植した胚を長期培養しながら自在に血管の観察と操作ができることを示した。ニワトリ胚は実験動物の中でも制約が小さく（微生物や動物細胞と同程度）、循環器系の構造もヒトと近い。また、安価（1 個 70 円程度）で、黄身で育つため外部からの栄養供給を一切必要としないという特徴を有する。

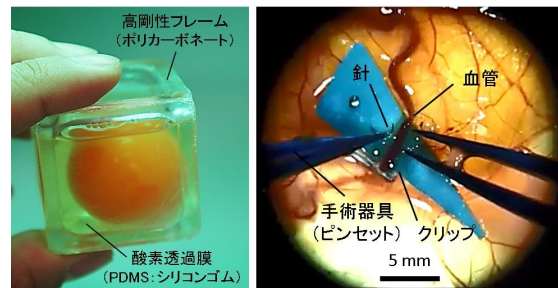
2. 研究の目的

以上のようなニワトリ胚の利点を活かし、図 1 (b) のように発生した血管を脳外科の手術トレーニングに応用することを試みてきたが、現場の医師からは訓練の効果をより高めるために、手技を行なっている際に術野周辺の血管や組織にかかっているおおよその力が測れないかという強い要望がある。これに対して、ニワトリ胚の内部にセンサなどの人工物（異物）を挿入すると生存率が低下したり、インクを目印として注入してもすぐに拡散してしまうという問題に直面した。以上のような背景から、たまご（白身）自体に本来備わっている特性を積極的に利用するという全く新しい着想を得た。

そこで本研究課題では、高い現実感と訓練効果が得られる微細手術シミュレータの実現を目指し、ニワトリ胚を透明人工殻内で培養しながら、胚周辺の卵白を局所的に熱凝固（ゲル化）させて天然由来のマーカを作製する技術を確立するとともに、マーカの移動量を人工殻の外側から視覚的に認識することで力センシングを行う技術を確立することを目的として実施した。

3. 研究の方法

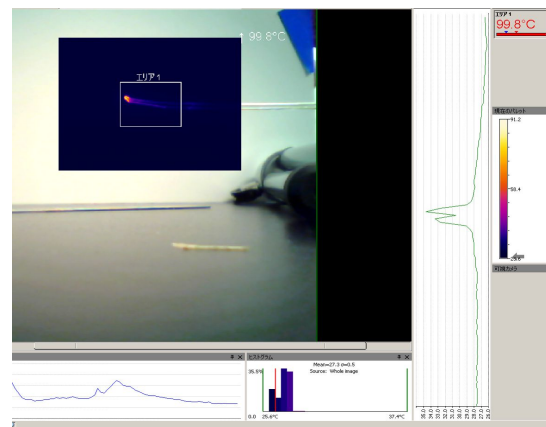
(1) 白身の局所凝固方法の確立と卵白マーカの作製：白身の局所加熱によりマーカ（構造体）を作製する方法論を確立するために、凝固に必要な条件を検討するとともに、作製可能な構造体の加工精度について考察を行なう。また、熱刺激が胚に与える影響についても調査する。



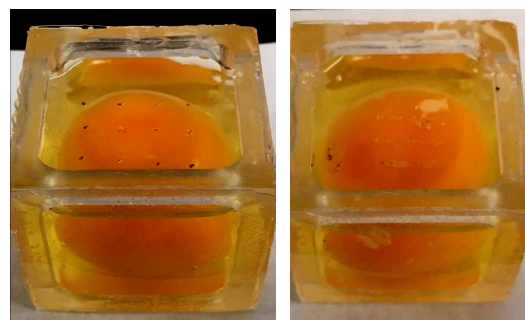
(a) 開発した人工殻 (b) 手術トレーニングの様子
図 1：透明人工殻の概要と応用例



(a) マイクロヒーターの外観



(b) サーモグラフィを用いた温度分布計測の様子
図 2：マイクロヒーターの開発と評価



(a) マーカの形成 (12点) (b) ライン形状の作製
図 3：白身の局所硬化

(2) 力センシングへの応用：ニワトリ胚を培養しながら作製したマーカを人工殻の外側から観察することで、内部で生じている力を計測する方法を検討し、術具による力学操作を行なった場合に内部で発生している力を推定することを試みるとともに、その精度について評価を行なう。

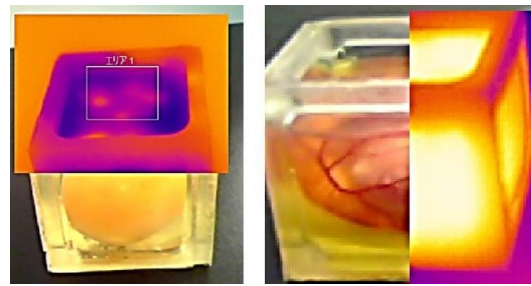
なお、ニワトリ胚を用いた実験に関しては、九州工業大学の動物実験委員会から「動物実験責任者」の認定を受けて実験を実施した。

4. 研究成果

(1) マイクロヒーターの作製と評価：実際に局所的に加熱するヒーターを作製するには、先端部分だけ電極の抵抗値を大きくして温度を上げる必要がある。また、先端部以外ではできるだけ他の生体組織に影響を与えないように昇温を抑える必要がある。以上の制約条件を踏まえ、図 2 (a) に示すようなマイクロヒーターを開発した。当初は、ガラス基板に微細加工技術を用いて電極形成を行なう方法を検討したが、温度分布の制御と柔軟性に欠ける問題があったため、比較的導電性の高い精密ニッケルパイプ（内径：450 μm 、外形：250 μm ）と抵抗値の大きなニクロム線（直径：200 μm ）をアSEMBリし、精密熱収縮チューブで絶縁することによりヒーターを構成した。また、これに対して電流を加えた際の温度分布を図 2 (b) に示すようにサーモグラフィで計測し、適切な条件について検討を行った。結果として、瞬間的に 1 A 程度の電流をヒーターに加えることで、図に示すように局所的に 100 程度に温度制御できることを確認した。また、ヒーター自体は自在に折り曲げて使用でき、ニワトリ胚（白身）の深い部分にも挿入できることも確認できた。

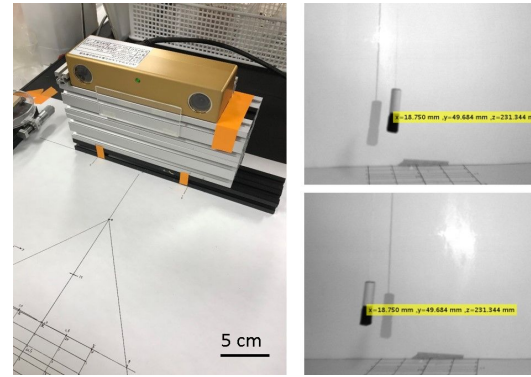
(2) マーカ作成方法の検討：次に、実際に作製したヒーターを白身（無精卵）へ押し当て、温度をリアルタイムにモニタリングしながら、培養温度（39）からゲル化温度（58～80）まで上昇させることで、マーカの作製条件の検討を行った。結果として、ヒーター自体の温度が白身によって下がってしまう影響があるものの、条件を調整することで図 3 (a) に示すように白身の表面に直径が数 100 μm の精度で 10 個以上のマーカを数十秒程度で作製できることを確認した。また、画像処理を行ってマーカの認識まで考えた場合には、温度を高め設定して図のように白身を瞬間的に高温で加熱することで焦がす（黒マーカにする）ほうが背景からの分離が容易であることも分かった。なお、図 3 (b) に示すようにライン状などの硬化も可能であり、原理的にはさらに多数のマーカを作成可能であるが、ヒーターの移動と加熱に時間がかかってしまうため、将来的なマーカの高密度化のためにはヒーターを並列化することが望ましい。一方で、白身の深部にヒーターを挿入して硬化させる場合、硬化後にヒーターを引き抜く際に硬化した白身自体がヒーターに固着してしまい、うまくマーカを配置できない問題が生じることが分かった。

(3) ニワトリ胚への影響：以上のような結果を踏まえ、図 4 (a) に示すように無精卵を用いて白身表面でのマーカ形成時の温度分布を調査した後、図 4 (b) に示すように有精卵へ応用して成長への影響の有無について調査した。結果として、白身の表面部分だけにマーカを形成した胚については 10 日間程度



(a) 温度分布の検証 (b) 有精卵への応用

図 4：ニワトリ胚への影響



(a) セットアップの外観 (b) マーカの追跡

図 5：マーカ追跡システムの概要

の培養では、通常人工殻で培養した場合と比較しても成長や生存率に大きな違いは見られなかった。今後は、さらに成長した後のニワトリ胚を固定化・解剖して部位別にサイズの計測を行なうなど詳細に形態への影響を調査する必要がある。また、従来開発しているタイムラプス観察システムを用いて心拍数等の変化についても調査を行なう予定である。

(4) 力センシングの検討：従来研究において、透明弾性体の内部にマーカを埋め込んで、力が弾性体に加わった際のマーカの変位をカメラで観察することで内部に発生する力ベクトル分布を計測する方法が提案されており、本研究課題ではこの方法を応用して力センシングを試みる。まず、力センシングの基本原則を検討するために、実際の手術トレーニングの動作空間を想定し、ステレオカメラを用いて図 5 (a) に示すようなシステムを構成した。このシステムを用いて、マーカを撮影し、その際の 3 次元的な移動距離を求めるソフトウェアの開発とその精度評価を行った（図 5 (b)）。結果として、マーカの追跡自体は可能であったものの、画像処理の速度（リアルタイム処理）や精度（1 mm 以下）が現状のシステムでは達成が難しいことが確認された。今後は、システム性能や画像処理方法を見直すことでマーカの位置変化から力ベクトル分布をオフラインで推定することを試みる予定である。最終的には、ニワトリ胚の内部に発生している力分布の強弱を 10 段階程度で提示できるようにすることを数値目標として研究を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Wenjing Huang, Makoto Itayama, Fumihito Arai, Katsuko S. Furukawa, Takashi Ushida, and Tomohiro Kawahara, An angiogenesis platform using a cubic artificial eggshell with patterned blood vessels on chicken chorioallantoic membrane, PLoS ONE, 査読あり, 12(4), e0175595, 20 pages, 2017.

〔学会発表〕(計9件)

板山真, 福田将大, 川原知洋, 微細パターンを付与した人工殻を用いたニワトリ胚漿尿膜の部分誘導とその応用, 生命科学系学会合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会), 2017年12月6日, 神戸ポートアイランド(神戸).

Makoto Itayama and Tomohiro Kawahara, 3D blood vessel shaping of chick embryo for mechanobiology research 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ -TAS), 2017年10月23日, Savannah (USA).

板山真, 川原知洋, マイクロ流路を有する人工殻で培養したニワトリ胚の血管誘導メカニズムの解明と応用, 第36回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2017年10月5日, 桐生市市民文化会館(桐生).

Yusuke Tashiro, Hirofumi Ohtsuka, and Tomohiro Kawahara, An experimental study on operability of master-slave manipulator system using human-in-the-loop type simulator, International Conference on Mechanical, Aeronautical and Automotive Engineering (ICMAA), 2017年3月11日, Penang (Malaysia).

板山真, 川原知洋, 黄文敬, 新井史人, 機能性人工殻で培養したニワトリ胚の三次元的血管誘導, 第17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, 2016年12月16日, 札幌コンベンションセンター(札幌).

板山真, 川原知洋, ミクロマクロ同時タイムラプス観察システムの開発とニワトリ胚への応用, 第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月2日, パシフィコ横浜(横浜).

Tomohiro Kawahara, Wenjing Huang, Makoto Itayama, and Fumihito Arai, Biotic Cube: chick embryo based 3D-2D hybrid platform for angiogenesis research, 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ -TAS), 2016年10月10日, Dublin (Ireland).

Yusuke Tashiro, Hirofumi Ohtsuka, and Tomohiro Kawahara, Human-in-the-loop type simulator of master-slave manipulation system for micro surgery, International GIGAKU Conference in Nagaoka (IGCN), 2016年10月7日, Nagaoka (Japan).

川原知洋, 板山真, 黄文敬, 新井史人, マイクロパターンを付与した人工殻を用いたニワトリ胚の血管誘導, 日本機械学会2016年度年次大会, 2016年9月13日, 九州大学伊都キャンパス(福岡).

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計1件)

名称: ウェットボックス及びそれを用いた低侵襲手術用トレーニング装置

発明者: 川原知洋, 藤井悟, 大脇浩史, 新井史人

権利者: 国立大学法人九州工業大学

種類: 特許

番号: 第5939536号

取得年月日: 2016年5月27日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

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

受賞

1. 化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会優秀発表賞 [2017.10.5]
2. 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 SI2016 優秀講演賞 [2016.12.18]
3. International GIGAKU Conference in Nagaoka, Poster Award [2016.10.7]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川原 知洋 (KAWAHARA, Tomohiro)

九州工業大学・大学院生命体工学研究科・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

(3) 研究協力者

黄 文敬 (HUANG, Wenjing)

東京大学・大学院工学系研究科・研究員