

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240075

研究課題名(和文) 培養細胞組織のダメージフリー操作のためのマイクロマシン

研究課題名(英文) Research on a micromachine for cellular aggregate manipulation without damage

## 研究代表者

小西 聡 (Konishi, Satoshi)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：50288627

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 30,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、培養細胞組織のダメージフリー操作のためのマイクロマシン研究に取り組み、ピンチ型とフロー型のマイクロマシンについて研究を進めた。  
ピンチ型は、圧力駆動マイクロフィンガーにより組織を把持・リリースする。560 $\mu\text{m}$ ×800 $\mu\text{m}$ のフィンガーを設計、製作し、96マイクロウェルプレート内の細胞組織の把持・リリース操作に成功した。リリースでは、フィンガー表面の改良により安定化を図った。フロー型は、マイクロウェル内壁とデバイスが形成する空間を活用し、デバイス流路を併用したものを設計、製作した。細胞組織の捕捉、そしてリリースについても高確率で成功するに至っている。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to develop a micromachine for cellular aggregate manipulation without damage. We proposed two types of micromachines based on pinching and flow controlling, respectively. Pinching type micromachine holds and release by using micro fingers which is pneumatically driven. 560 $\mu\text{m}$ ×800 $\mu\text{m}$  micro fingers could catch and release a cellular aggregate of 200 $\mu\text{m}$  in diameter in a 96 micro-well-plate. Surface modification of micro fingers improved a success rate in releasing. Flow controlling type micromachine utilized a space between an inner wall of a micro well and micromachine itself. It could capture and release a cellular aggregate of 250 $\mu\text{m}$  in diameter in a 96 micro-well-plate.  
Based on the results, improvement of throughput in manipulation is ongoing for further practical manipulator.

研究分野：マイクロマシン

キーワード：培養細胞組織 マイクロマシン バイオ操作

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、圧力駆動マイクロバルーンアクチュエータ (Pneumatic Balloon Acuator:PBA) を用いたマイクロハンドによる微小生体の操作研究を手始めに、低侵襲内視鏡用ツール、眼球内への細胞シート移植ツール等への応用で成果をあげてきた。代表的特許として、特願 2005 - 21730、特願 2007 - 10452 を保有している。一方、操作対象となる培養細胞に関して、研究代表者らは、2006年に細胞シートの眼球内移植の研究を開始し(東京女子医大と共同)、さらに ES 細胞、iPS 細胞の再生医療応用研究に積極的な理化学研究所の参画も得、科研費(基盤研究(B)(一般))「再生医療移植技術支援のためのマイクロマシン基盤技術の研究開発」を実施してきた。

今回新たに着目した細胞集合体に関して、分担研究者の田畑らが実績を持つ。細胞集合体は体内状態に近く、薬の代謝、薬理作用評価など創薬研究に大きく貢献する。田畑らは世界に先駆けて独自の細胞集合体培養手法を構築し、3次元細胞集合体育成に成功している。

一方、細胞集合体は大きさ 50 $\mu\text{m}$  から 300 $\mu\text{m}$  と微小の上、現状その扱いは人手に依存し、熟練者でもダメージフリーの操作は難しい。現在、培養細胞組織を特定のウェル内に移動させる手法にはピペットを用いることが主流である。しかしながら、不確かさ、同時に複数個の培養細胞組織を操作困難という課題がある。

細胞を扱う技術への Micro Total Analysis Systems ( $\mu\text{TAS}$ ) 技術の応用が盛んになっており、同時に複数個の培養細胞組織を培養、試薬導入、観察、回収が可能な新たなデバイスとして開発されている。そこで研究代表者らは共同特許出願をし(特願 2011 - 103920) 取組みを開始しており、本研究により国家的に推進中の培養細胞組織の実用化研究のキーテクノロジーとして、マイクロ・ナノ技術を駆使した「培養細胞組織のダメージフリー操作のためのマイクロマシン」の実現を目指すことにした。

## 2. 研究の目的

創薬や再生医療への利用が期待される培養細胞組織の研究が大々的に進んでいる。一方、その成果の応用には、培養後の細胞組織を分析工程や移植手術に持ち込む技術が必須となる。研究代表者は既に、細胞シートの眼球内移植用マイクロマシンの研究を実施し、成果をあげてきている。本研究ではこれまでの実績をさらに展開し、新たな培養細胞組織として創薬応用のための細胞集合体に着目する。2次元的な細胞シートと異なり3次元組織の細胞集合体は新たに克服すべき課題も多いと考えられ、研究対象として重要である。培養系や分析系の要求仕様も満たす必要がある。細胞集合体の早期の実用化が期

待されている創薬応用において、創薬現場で急務と考えられる培養細胞組織を傷つけないで扱うマイクロマシンの実現を目指す。

## 3. 研究の方法

「培養細胞組織のダメージフリー操作のためのマイクロマシン」の実現に向け、マイクロマシンをコア技術とし、周辺機構(流体制御、位置制御、観察)研究と連携させる。同時に培養細胞集合体を用いた生体評価実験による評価・課題抽出を実施する。研究ではフェーズ( )を設定する。

第フェーズでは、まず現状保有技術の新規対象となる細胞集合体に対応させ、マイクロマシンと周辺機構による系を構築する。

第フェーズでは、構築した系について、研究体制を活用した生体評価実験により課題を抽出する。抽出課題に対して研究内容を重点化し、課題の克服を図る。

第フェーズでは、マイクロマシンおよび周辺機構からなる系を再構築し、生体評価を含めた各種性能評価を実施し、3年間の研究成果を出す。

本研究では、現在広く使われている 96 穴マイクロウェルプレートを使用したいという現状技術との整合を鑑み、96 穴マイクロウェルプレートに対応した培養細胞組織操作マイクロマシンの実現に取り組むことにした。コア技術となる培養細胞組織操作マイクロマシンとして、研究代表が実績を有する圧力駆動マイクロバルーンアクチュエータ(PBA)を基盤技術として進めるアプローチに加え、前述の  $\mu\text{TAS}$  技術を活用した斬新なアプローチも提案し、並行して研究を進めることにした。

研究を開始するにあたり、第1フェーズで計画中のプロトタイプ仮構築を主とする FS (試験研究)の早期実施を重視した。

## 4. 研究成果

研究の方法のところで述べたように、本研究は三つのフェーズを設定し、おおよそ、プロトタイプ仮構築(フェーズ )、評価・改良(フェーズ )、再構築(フェーズ )の内容で研究を進めた。

また、実績のある圧力駆動バルーンアクチュエータ(PBA)を基盤技術としたピンチ型と呼んでいるマイクロマシンに加え、流体制御機能を有したフロー型のマイクロマシンを新たに提案し、研究を推進した。

### (1) ピンチ型マイクロマシン

ピンチ型マイクロマシンは、マイクロフィンガーにより培養細胞組織を把持・リリースすることを可能とする。2つの PBA を接合した構造を採用し、開閉方法として「常時閉 圧力印加時に指が開く 圧力解放時に指が閉じる」を採用した(図1)。この開閉方法により、マイクロウェル底面の培養細胞組織に到達することが可能になる。本研究では、ピン

チ型マイクロマシンのマイクロフィンガーを用いた操作例として、96 マイクロウェルプレート内の培養細胞組織（直径約 200  $\mu\text{m}$ ）を対象として把持操作を設定した。560  $\mu\text{m}$   $\times$  800  $\mu\text{m}$  のフィンガーサイズのものを設計、製作した。

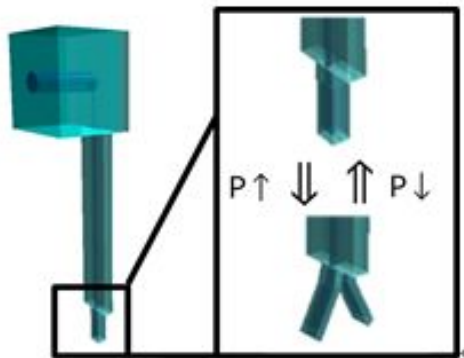


図1 ピンチ型の設計

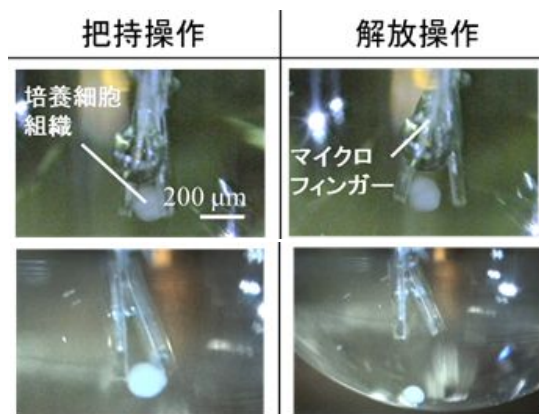


図2 ピンチ型の実現結果

操作手順は、初期状態、対象に対して位置合わせ、対象を把持、別のウェルへ移動、移動後静止、対象を解放、である。マイクロフィンガーの設計はマイクロウェルの形状と培養細胞組織の形状を考慮し設計を行った。製作方法は、PBA の構造をパターン転写技法であるソフトリソグラフィによって製作を行う。単純に PBA どうしを向かい合わせに接合した場合、PDMS の密着性により、圧力を印加した際に指が開かない。よって、接合前に指どうしが合わさる面にパリレンC膜をコーティングすることにより、密着性を抑制し、指を開くことを可能とした。製作したマイクロフィンガーを用いて培養細胞組織の把持・解放実験を行った（図2参照）。実験の結果、培養細胞組織を把持に成功した。しかしながらリリース操作が不安定であり、接着した培養細胞組織をマイクロフィンガーから離すことが困難な場合もみられた（図2右上）。そこで、マイクロフィンガー接触面の材料であるパリレンCの濡れ性に着目し、その制御を行うことによりリリース操作の安定化を実現した（図2右下）。以上の成果に基づき、ピンチ型マイクロマシ

ンは、開発した位置決め機構を用いて対象の把持/リリースに成功し国際会議で成果を報告した。さらに、第2プロトタイプでは、操作スループットを向上するためにマイクロマシンをアレイ化して8個の列構成とし、8  $\times$  12の96マイクロウェルプレートに対して位置をシフトしながら、12列、96ウェルを扱うシステムを実現した。特に、アレイ化に関する設計・製作技術、位置シフトシステムの実現で成果を挙げる事ができた。

## (2) フロー型マイクロマシン

フロー型マイクロマシンとして、マイクロウェル内壁とデバイスが形成する空間とデバイス流路を併用した構成を提案した(図3)。培養細胞組織を流体で移動させ、デバイス捕捉部で捕える。そして培養細胞組織を捕捉部に入れたまま、ウェルの外へ培養細胞組織を取り出す。また、複数のデバイスを同時使用することで、効率良く培養細胞組織を操作可能である。

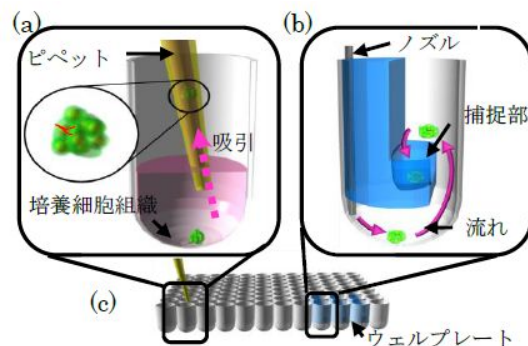


図3 従来手法 (a) とフロー型の設計 (b)

本手法の有用性を検証するために水で満たしたウェル内に着色した液体を流し、ウェルに沿った流れを観察した。解析でも同様の流れを確認した。図4にウェルに組み込んだデバイスを示す。製作プロセスは型にPDMSを成型し、切削により所望の構造を形成する。形成したデバイスに中空針を組み込み、ウェルに設置することで完成する。

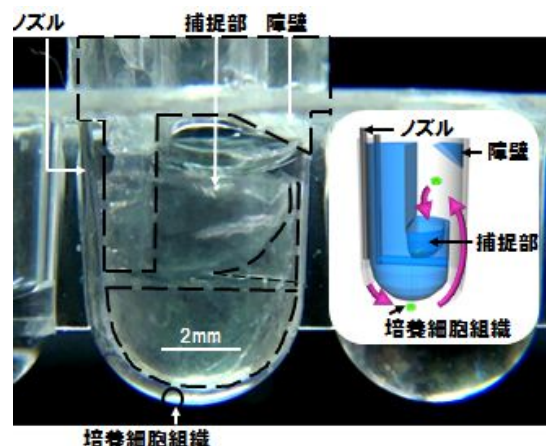


図4 マイクロウェルに設置したフロー型

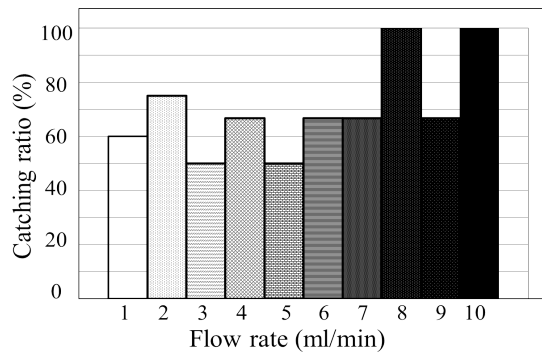


図5 流量と捕捉率の関係

予備実験として、擬似培養細胞組織約 $\Phi 900\mu\text{m}$ を用い捕捉の評価を行った。まず擬似培養細胞組織(アルギン酸ゲル)を用い、評価実験を行った。擬似培養細胞組織はウェル内の流れに沿った動きを示した。次に、培養細胞組織 $\Phi 250\mu\text{m}$ を用いた評価実験においても捕捉に成功した。実験結果を図5に示した。流量10 ml/minの場合、捕捉率100%を達成することができた(試行回数各流量ごとに3回)。また、リリースについても高確率で成功するに至っている。

### (3) 成果のまとめと今後の展望

以上、第、フェーズでプロトタイプ提示したピンチ型とフロー型の二種類の培養細胞組織操作マイクロマシンについて、第フェーズではピンチ型を重点化して実用化を意識した研究を進めた。ピンチ型マイクロマシンを用いて対象細胞組織への位置決め移動や把持・移動・リリース操作の自動化についても研究を進め、システムを提示するなど結果を得ている。フロー型については学術論文にまとめ採択公表に至った。また、実用化に重要となる培養細胞組織へのダメージ評価を実施し、目標としたダメージフリーの観点からの本手法の有効性を確認した。バイオマテリアル研究に強い研究分担者との連携研究が可能とする研究成果の典型例といえる。

本研究では、創薬や再生医療への利用が期待される培養細胞組織に関する有効な研究成果を実現することができた。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Satoshi Konishi, Yumi Teramachi, Shuhei Shimomura, Wataru Tonomura, Shuhei Tajima and Yasuhiko Tabata, Cellular aggregate capture by fluidic manipulation device highly compatible with micro-well-plates, Biomedical Microdevices, 査読有、Volume 17, Issue 3(in press), DOI: 10.1007/s10544-015-9953-x

[学会発表](計4件)

下村周平、寺町有未、村松遥子、田島脩平、田畑泰彦、小西聡、圧力駆動バルーンアクチュエータを利用したマイクロフィンガーによる培養細胞の把持・解放操作、日本機械学会 ロボティクス・メカトロニクス講演会、平成26年5月28日、富山市総合体育館(富山県)

S. SHIMOMURA, Y. TERAMACHI, Y. MURAMATSU, S. TAJIMA, Y. TABATA and S. KONISHI, PINCHING AND RELEASING OF CELLULAR AGGREGATE BY MICROFINGERS USING PDMS PNEUMATIC BALLOON ACTUATORS, IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2014.1.30, San Francisco, USA

寺町有未、下村周平、殿村涉、田島脩平、田畑泰彦、小西聡、マイクロウェル内流体制御による培養細胞組織捕捉デバイス、センサ・マイクロマシンと応用システムシンポジウム、平成25年11月6日、仙台国際センター(宮城県)

Y. Teramachi, S. Shimomura, W. Tonomura, S. Tajima, Y. Tabata, and S. Konishi, CELLULAR AGGREGATE CATCHER USING FLUIDIC MANIPULATION IN HIGH COMPATIBILITY WITH WIDESPREAD MICRO-WELL-PLATE, International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, 2013.6.18, Barcelona, Spain

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 細胞塊取得装置

発明者: 小西聡、田畑泰彦、和田貴志、萩原文弘

権利者: 学校法人立命館、旭光電機株式会社

種類: 特願

番号: 2013-125102

出願年月日: 平成25年6月13日

国内外の別: 国内

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

小西 聡 (KONISHI, Satoshi)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号: 50288627

#### (2) 研究分担者

田畑 泰彦 (TABATA, Yasuhiko)

京都大学・再生医科学研究所・教授

研究者番号: 50211371

殿村 涉 (TONOMURA, Wataru)

立命館大学・理工学部・助教

研究者番号: 50581493