

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13601

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2019

課題番号：16KK0147

研究課題名（和文）生命維持機能を持つOrgan-on-chip型Living Machineの創成（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Toward living machine with life-maintaining function by organ-on-chip technology
(Fostering Joint International Research)

研究代表者

秋山 佳丈 (Akiyama, Yoshitake)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：80585878

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 8ヶ月

研究成果の概要（和文）：生体と機械を融合させるバイオハイブリッドロボティクスは、現在、最も挑戦的なロボティクス分野の一つとなっている。本研究では、工学的観点から筋駆動型バイオハイブリッドデバイスについて考察した。また、マイクロ流体工学により酸素供給を改善することで、壊死を伴うことなくより太い筋組織の構築が可能となり、さらには電気刺激培養を行うことで、筋組織の収縮力向上が望まれることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、生体と機械を融合させるバイオハイブリッドロボティクスの設計論確立に向けて、これまでの知見を纏めた。生体筋組織を駆動源とすることが出来れば、環境にやさしい機械システムの構築が可能になり、サステナブルな社会構築に向けて大きな前進となるだろう。

研究成果の概要（英文）：Biohybrid robotics that integrates living components into synthetic structures is currently one of the most challenging fields of robotics. We present an overview of muscle actuated biohybrid devices from the viewpoint of engineering. The techniques to improve oxygen supply like microfluidics would relieve limits on size of muscle bundles. It was also shown that electrical stimulation easily enhance the contractile force of tissue engineered muscle.

研究分野：マイクロナノメカトロニクス，バイオロボティクス

キーワード：バイオハイブリッド マイクロフルイディクス MEMS バイオアクチュエータ

1. 研究開始当初の背景

生体と機械を融合させるバイオハイブリッドロボティクスは、現在、最も挑戦的なロボティクス分野の一つとなっている[1]。バイオハイブリッドデバイスの開発戦略は、生体材料をどのレベルで融合させたかによって3つに分類される。第一は、生物全体をロボットとしてハックする生物レベルでの融合である。例えば、ラットは脳に電気刺激を与えて仮想的な合図と報酬を与えて誘導していた。また、カブトムシの運動は、各運動に対応した各筋肉を電氣的にシミュレーションすることで制御されている。また、昆虫の体液を利用して発電するゴキブリのバックパック型バイオ燃料電池をワイヤレスセンシングに応用した実証実験を行った。第二に、細胞・組織・器官レベルでの融合である。一般的には、生体外で培養した筋肉組織や細胞がアクチュエーターとして用いられる。カイコ蛾の触覚は、移動ロボットのフェロモンセンサーとして利用されている。最後に、生体運動の最小単位である分子モーターを利用した分子レベルでの融合である。例えば、分子モーターの一方向回転や光学表示装置は、微細加工技術を用いて実証されている。

このようなバイオハイブリッドロボットの中でも、筋肉を利用したバイオハイブリッドデバイスは、機械工学のみならず、バイオエンジニアリングや材料化学の研究者からも注目されている。筋は、人工的なマイクロアクチュエーターと比較して、エネルギー変換効率が高いこと、電気や化石燃料に依存しないこと、柔らかくて小さいこと、自己修復が可能であることなど、いくつかの特徴的で望ましい利点を持っている。特に、自然のナノテクノロジー分子モーターを利用するためのパッケージされた簡便な方法として筋肉の使用を検討することができる。最近では、文献[2]をはじめバイオハイブリッドデバイスに関するいくつかのレビュー論文が発表されており、出版論文等の書誌学的分析結果は、この研究分野への関心の高まりを示している。

2. 研究の目的

筋駆動バイオハイブリッドデバイスの設計方法についてのガイドラインはまだほとんどない。いくつかの重要項目として以下の3つがある。(i) どのようなタイプの筋細胞を、どのような生物のどのタイプの筋細胞から、用途に合わせて選択すべきか？(ii) どのような方法で、剥離や破裂を最小限に抑えながら力の伝播を最大化するために、筋は人工構造物とどのように連動すべきか？(iii) 出力を最大化するにはどうすればよいか？本研究においては、特に、筋肉の特性、筋の生体インターフェース、および出力の最大化に関連する3つのトピックに焦点を当て、書籍にまとめた[3]。本成果報告では、高密度の筋細胞培養を可能にするための酸素供給に関して、有限要素解析により考察し、さらに、筋細胞をコラーゲンゲル内で培養し筋組織を構築する際の電気刺激培養の条件検討についても取り組んだ。

3. 研究の方法

(1) 酸素濃度分布の有限要素解析

理想的には、組織工学的に作られた筋肉の溶存酸素濃度は、体内の筋肉と同じくらい高いことが望ましい。生理学では、ガス濃度の指標として分圧が用いられる。教科書によれば、 O_2 の分圧 (pO_2) は末梢組織で 40mmHg である。 pO_2 は、ヘンリーの法則に基づいて酸素濃度 c と互換性がある。すなわち、 $c = \alpha pO_2$ 、ここで α は 1.39×10^3 [mM / mmHg] [4] である。媒体を大気圧に新鮮に平衡化したものと仮定すると、媒体中の pO_2 は 160 mmHg となる。生体組織中の c は 0.056 mM、新鮮な培地中の c は 0.222 mM と計算される。組織中のこの c の値は、組織が低酸素状態にあるとみなす基準閾値として利用した。

酸素濃度は、筋肉内の酸素消費量の項を含む以下の反応拡散式に基づいて計算し、有限要素法 (FEM) で解析した。

$$-D\nabla^2 c - R_{oxy} = \frac{\partial c}{\partial t}$$

ここで、 D : 酸素の拡散係数、 c : 酸素濃度、 R_{oxy} : 酸素消費率 (OCR)。この方程式を、市販の FEM ソフトウェア COMSOL Multiphysics を用いて解いた。培地、組織、PDMS における D の値は、それぞれ $2.8 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 $9.5 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、 $7.88 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ とした[5]。筋の OCR である R_{oxy} は $8.87 \text{ nmol } O_2/\text{cm}^3/\text{s}$ とした[109]。シミュレーションは、過渡的な条件で、3時間行った。

(2) 筋細胞のゲル培養

自動的に電気刺激を行いつつ培養液を交換する自動電気培養システムを開発した。その概要を図1に示す。市販の6ウェルプレートにテフロン製のゲルモールドを設置し、その中で筋組織を構築した。電気刺激のための波形は、DAQデバイス(USB-6001, National instruments)により生成され、アンプにより増幅されて、白金電極を通して各ウェルに印加された。また、3ウェルが並列に接続され、同一条件で計6本の筋組織が培養出来るようになっている。培養液の交換は、ポータブル培地交換システム(高砂製作所, CEME-0105)により行った。

4. 研究成果

(1) 筋組織工学における酸素供給
 一般的に、筋細胞をコラーゲンゲル内で培養することで、筋組織を再構築することができるが、その収縮力は胎児と比べても一桁程度弱い。そこで、より強い筋組織の構築に向けて、既存の研究を調査し、Takayama 教授を含む関連研究者と議論し、特に、筋組織内への酸素供給が不十分であることが問題であるという結論に達した。一方で、CO₂の濃度は、酸素の30倍という高い溶解度のため、考慮する必要はないと考えられる。CO₂は媒体に溶解することができ、一般的には容易に散逸する。

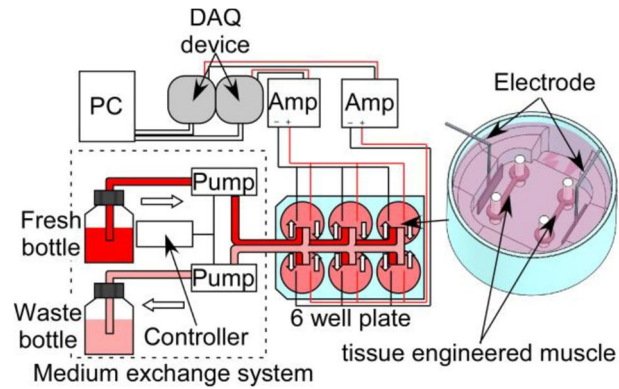


図1 自動電気刺激培養装置。

そこで、有限要素法により拡散方程式を解くことで、筋組織内の酸素分布を評価した。その結果、直径が150マイクロメートル程度の筋組織においてのみ、生体の末梢組織と同濃度の酸素が供給されており、300マイクロメートルを超えると、表層の100マイクロメートル程度までしか十分に供給されていないことが分かった。これは、従来研究においても、表層から0.15mm程度まで筋細胞が十分に分化していなかったという報告と一致する。また、従来より行われている培養皿における静置培養に対し、マイクロ流体デバイスを用いることで酸素供給が改善されることも確認できた。その結果を、図2に示す。ただし、図2bに示すように、管路壁面からの酸素供給が無い場合は、直径

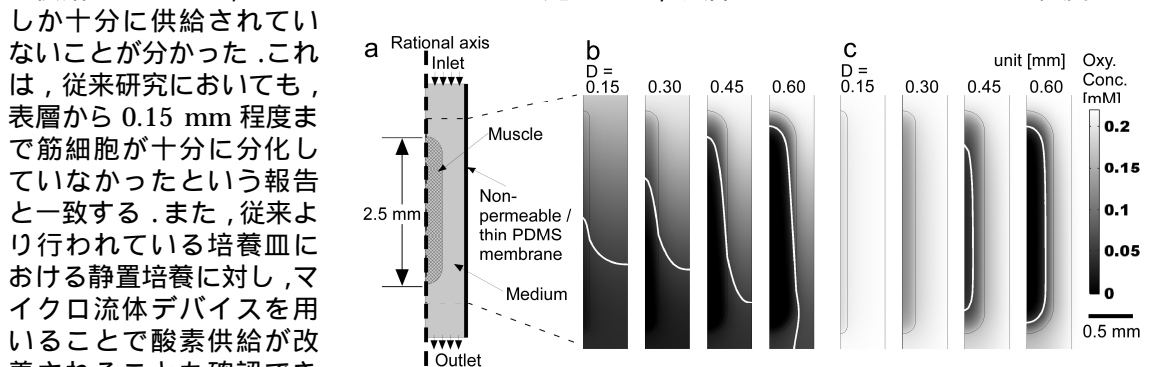


図2 マイクロ流体デバイスで筋組織を培養した場合の酸素濃度分布。(a)解析モデル、(b)壁面からの酸素供給が無い場合、(c)壁面から酸素供給がある場合。

0.15mmといえど、十分に酸素が供給されないことが示された。その一方で、図2cに示すように、管路壁面を0.1mmのシリコンゴム(PDMS)製として、酸素供給を行うと、直径0.3mmの筋組織についても十分に酸素を供給できることが示された。

(2) 電気刺激培養した筋組織の評価

電気刺激培養された人工生体筋組織の力学的評価を行うために単収縮および強縮の等尺性収縮力の測定を行った。単収縮を測定するために、単発パルス(電圧0.71V/mm, パルス幅10ms), 強縮を測定するために連続100パルス(電圧0.71V/mm, パルス幅10ms, 周波数50Hz)を与えた。張力測定の結果をFig. 3に示す。単収縮の収縮力は、1 pulse > 100 pulses > コントロール > 10 pulses となった。また、強縮の収縮力は、100pulses > 1 pulse > コントロール > 10 pulse となった。単収縮および強縮のどちらにおいても、連続10 pulses は収縮力が低下した。同じ電圧の1 pulse と比べて、収縮力が低下していることから、電気刺激が逆に筋組織にダメージを与えてしまったと考えられる。一方、刺激電圧を下げた連続100 pulses において、最も収縮の強い筋組織が作製された。

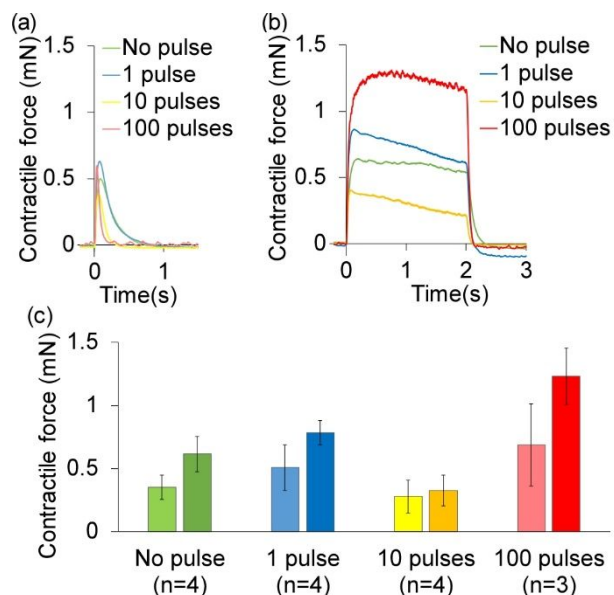


図3 各電気刺激培養条件における筋組織の収縮力評価。(a)単収縮時の時間変化、(b)強縮時の時間変化、(c)最大収縮力の比較。

(3) 今後の展望

本研究では、工学的観点から筋駆動型バ

イオハイブリッドデバイスについて考察した。バイオハイブリッドデバイスの分野は発展途上であり、工業的な段階には十分に成熟していない。本研究で得られたバイオハイブリッドデバイスを設計するためのプロセスは以下の通りである。用途に適した筋肉を選択し、それを人工構造体上に組み立てる方法を決定する。骨格筋束を組み立てる方法が確立されているので、組織工学的に設計された骨格筋が第一選択となる可能性がある。筋束のサイズおよび数は、デバイスに必要な収縮力に基づいて決定される。文献によれば、骨格筋束は壊死を避けるために 0.15mm 以下であることが望ましいとされている。マイクロ流体工学のような酸素供給を改善する技術、媒体への酸素キャリアの添加、および高レベルの酸素を有する雰囲気は、必要に応じて、筋束のサイズの制限を緩和するだろう。電気刺激は、筋収縮を制御するための最も簡単で一般的な方法である。煩雑な配線の必要性および電気分解の副作用を考慮すると、オプトジェネティクスは、バイオハイブリッドデバイスの制御のために好ましい利点を有する。

<引用文献>

- [1] Yang, G. Z., Bellingham, J., Dupont, P.E. et al. (2018) The grand challenges of Science Robotics. *Science Robotics* 3 (14): eaar7650.
- [2] Ricotti, L., Trimmer, B., Feinberg, A.W. et al. (2017) Biohybrid actuators for robotics: A review of devices actuated by living cells. *Science Robotics* 2 (12): eaaq0495.
- [3] Y. Akiyama, S-J. Park, S. Takayama, Design considerations for muscle-actuated biohybrid devices, in *Nanotechnology and Microfluidics, First Edition: John Wiley & Sons, Ltd, 2019: pp. 347–381.*
- [4] Valabrègue, R., Aubert, A., Burger, J. et al. (2003) Relation between cerebral blood flow and metabolism explained by a model of oxygen exchange. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 23 (5): 536–545.
- [5] Kim, M.-C., Lam, R.H.W., Thorsen, T., et al. (2013) Mathematical analysis of oxygen transfer through polydimethylsiloxane membrane between double layers of cell culture channel and gas chamber in microfluidic oxygenator. *Microfluidics and Nanofluidics* 15 (3): 285–296.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiyama Yoshitake, Shinose Masato, Watanabe Hiroki, Yamada Shigeru, Kanda Yasunari	4. 巻 116
2. 論文標題 Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 7738 ~ 7743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1808645116	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yalikun Yaxiaer, Uesugi Kaoru, Hiroki Minamida, Shen Yigang, Tanaka Yo, Akiyama Yoshitake, Morishima Keisuke	4. 巻 8
2. 論文標題 Insect Muscular Tissue-Powered Swimming Robot	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Actuators	6. 最初と最後の頁 30 ~ 30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/act8020030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Uesugi Kaoru, Sakuma Yui, Akiyama Yoshitake, Akiyama Yoshikatsu, Iwabuchi Kikuo, Okano Teruo, Morishima Keisuke	4. 巻 33
2. 論文標題 Temperature-responsive culture surfaces for insect cell sheets to fabricate a bioactuator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Robotics	6. 最初と最後の頁 219 ~ 231
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01691864.2019.1568908	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Y. Akiyama
2. 発表標題 Atmospheric-operable bioactuator powered by insect cells
3. 学会等名 40th International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (IEEE EMBS) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中野 翔太, 瀧澤 秀世, 秋山 佳丈
2. 発表標題 骨格筋細胞ゲルアクチュエータの量産に向けた電気刺激培養システムの構築
3. 学会等名 第70回日本生物工学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 遠藤 佑真, 秋山 佳丈
2. 発表標題 骨格筋細胞ゲルアクチュエータのための直線-回転運動変換機構の検討
3. 学会等名 日本機械学会, 2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yoshitake Akiyama, Sung-Jin Park, Shuichi Takayama	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Wiley	5. 総ページ数 30
3. 書名 Design considerations for muscle-actuated biohybrid devices in Nanotechnology and Microfluidics	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる派生先の主たる海外共同研究者	高山 秀一 (Takayama Shuichi)	ジョージア工科大学・Wallace H. Coulter Department of Biomedical Engineering・Professor	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
その他の研究協力者	サンジン パク (Sung-Jin Park)	ジョージア工科大学・Wallace H. Coulter Department of Biomedical Engineering・Assistant Professor	