

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03202

研究課題名(和文) ゲル微粒子の疑似反磁性操作によるバイオハイブリッド3次元造形技術の創出

研究課題名(英文) Three-dimensional biohybrid fabrication with microgels by relatively diamagnetic assembly

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：微小な閉鎖空間内における生体親和性の高い3次元造形法を確立することが出来れば、細胞から組織や器官を基板上に作り出す“Organ-on-chip”の実現に大きく近づくことが出来る。本研究では、正と負に帯電した2種類のゲル微粒子を静電的に吸着させ造形するという新しい概念に基づき、研究代表者独自の非磁性粒子を磁場により凝集させる手法により、生体適合性の非常に高いバイオハイブリッド3次元造形法の確立した。さらに、このゲル微粒子に熱応答性高分子を含ませることで熱収縮性のアクチュエータとして機能することも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、光硬化剤によらない新たな3次元造形法を提案し実証した。本手法は、生体適合性が高く、ソフトなゲル構造体を構築できる。さらに熱応答性を付与することでソフトアクチュエータとしても活用可能である。近年注目を集める“Organ-on-chip”(基板上に各種臓器の微小な組織を構築し集積化したもの)等の開発に向けて、新たな手段を提供できるだろう。

研究成果の概要(英文)：If a three-dimensional fabrication method with high biocompatibility in a micro-enclosed space is developed, it would bring us much closer to the realization of "organ-on-chip" that can create tissues and organs with cells on a substrate. Based on the novel concept of electrostatically attaching two types of positively and negatively charged microgels, we developed a highly biocompatible biohybrid 3D fabrication method by using the original method that aggregate non-magnetic particles with a magnetic field. Furthermore, by adding thermo-responsive polymers to the microgels, it was confirmed that the microgel aggregate functioned as a heat-shrinkable actuator.

研究分野：バイオエンジニアリング, 生体医工学, マイクロナノメカトロニクス

キーワード：相対的反磁性アセンブリ ゲル微粒子 ソフトアクチュエータ

1. 研究開始当初の背景

近年、Micro Electro Mechanical Systems (MEMS)や Micro Total Analysis Systems (microTAS)と呼ばれる「半導体微細加工技術を利用し、ガラスやシリコン基板上に流路等を作り込み、システム全体を集積しようという分野」の研究が注目されている。特に、ここ数年の本分野の研究の進歩は著しく、生体内に近い培養環境を人工的に基板上に再現し、細胞から組織や器官を作り出す Organ-on-chip 関連の研究へシフトしつつある。Organ-on-chip が実現すれば、細胞生物学や再生医療の研究ツールのみならず、創薬探索において、特に近年、倫理的問題から廃止が叫ばれる動物実験の代替となり得る。これまでに、Organ-on-chip の実現に向けて、生物学的もしくは化学的な研究が多く見られるが、技術的見地からは既存技術の流用と併用に留まっており、機械工学的立場からの新たな技術の提案が望まれている。そのため、微小な閉鎖空間内における生体親和性の高い 3 次元造形法を確立することが出来れば、細胞から組織や器官を基板上に作り出す“Organ-on-chip”の実現に大きく近づくことが出来る。

2. 研究の目的

本研究では、正と負に帯電した 2 種類のゲル微粒子を静電的に吸着させ造形するという新しい概念に基づき、研究代表者独自の非磁性粒子を磁場により凝集させる相対的反磁性アセンブリ法により、生体適合性の非常に高いバイオハイブリッド 3 次元造形法を確立する。さらに、このゲル微粒子凝集体に熱応答性高分子を含ませることで熱収縮性のアクチュエータとなることを示す。

3. 研究の方法

(1) 粒子の相対的反磁性操作

本研究では、磁気アルキメデス効果を用いて粒子の凝集位置の制御を行った。粒子の磁化率を χ_p 、溶液の磁化率を χ_m 、粒子の体積を V 、真空の透磁率を μ_0 、磁束密度 B をとすると溶液中の粒子に作用する力は以下の式 (1) で表される。

$$F_m = \frac{(\chi_p - \chi_m)V}{2\mu_0} \nabla B^2 \quad (1)$$

通常の溶液中の粒子において、粒子と溶液の間の磁化率の差は無視できるほど小さいため、 $\chi_p = \chi_m$ となり、これを式 (1) に当てはめると $F_m = 0$ となり、粒子には力が働かない。一方、磁性粒子は、正の χ_p をもつため、磁化率の差は正となり、粒子には磁石に引き寄せられる力が働く。これに対し、相対的反磁性アセンブリ法では、磁性化合物を添加し溶液を常磁体化 ($\chi_m > 0$) することで磁化率の差を負とし、粒子には磁場に対する反発力を与えることで操作する。

本研究ではゲル微粒子が分散している溶媒に磁性を持たせ、粒子が磁力による浮力と重力による沈降力がつりあうところに集まる原理を利用して粒子を一箇所に集めた。そのセットアップを図 1 に示す。ゲル微粒子懸濁液の入ったチャンバーは、ネオジウム磁石と SUS430 板からなる磁石アレイの上に置かれた。特に、中央の SUS430 板に溝加工を施し、磁場の弱い領域を形成し、そこにゲル微粒子を凝集させた。

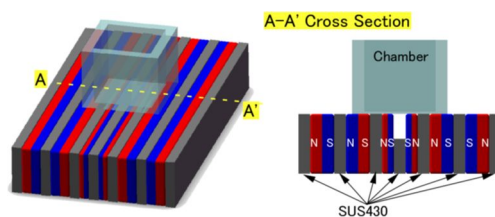


図 1 ゲル微粒子凝集実験のセットアップ。

(2) ゲル微粒子の合成と細胞毒性評価

まず、本造形法に適した新規ゲル微粒子として、正および負の電荷をもった温度応答性のゲル微粒子を開発した。水系沈殿重合法により、温度応答性水溶性モノマー N-isopropylacrylamide (NIPAm) を含むゲル微粒子を作製し、そこへ、アミノ基を付与することで正電荷をもったゲル微粒子(AET)を、スルホン基を付与することで負電荷をもったゲル微粒子(MPSA)を作製した。そして、このゲル微粒子を相対的反磁性アセンブリにより操作し、凝集体を形成した。

(4) ゲル微粒子凝集体の特性評価

ゲル微粒子凝集体を加熱冷却し、真上から観察することで、そのサイズ変化を観察し、温度応答性を評価した。加熱冷却は、ペルチエ素子を用いた専用のチャンバーを開発して用いた。また、ヤング率は押し込み試験により、簡易的に推定した。

4. 研究成果

(1) ゲル微粒子の細胞毒性評価

合成したゲル微粒子のマウス繊維芽細胞 3T3 に対する毒性を、乳酸脱水素酵素法により評価した。その結果を図 2 に示す。AET および MPSA で修飾されたゲル微粒子は、単体でも混合状態

でもその毒性が十分に低いことが確認できた。ゲル微粒子濃度が 0.02 % を越えると、特に AET 修飾のゲル微粒子で有意な細胞毒性が見られたが、本研究で用いる予定の 0.005 wt% では、細胞毒性はほぼないことが示された。

(2) ゲル微粒子凝集体形成

相対的反磁性アセンブリ法 (図 1) により、AET と MP SA ゲル微粒子を混ぜて凝集させることで、十分な強度をもった凝集体が形成されることを確認した。AET と MP SA ゲル微粒子の配合比を検討したところ、重量比 1 対 1 で最も安定なゲル微粒子凝集体が形成された。このときの粒子数の比は約 120 : 1 となり、これはちょうど大きい MP SA ゲル微粒子 1 つを AET ゲル微粒子が取り囲んでいる状態の比と一致するため、この状態で凝集していると推測された。

(3) ゲル微粒子凝集体の特性評価

ゲル微粒子凝集体を顕微鏡下において、25 度から 40 度の間で加熱冷却を繰り返した。その面積の変化を図 3 に示す。まず、最初の加熱により面積は大きく減少し、その後、加熱冷却操作を繰り返すにつれて共に一定の面積となるようになった。最終段階において、加熱による面積収縮率は 19% 程度となった。これを単純に長さに関する収縮率に換算すると 4.4% となり、マイクロアクチュエータとして十分に使えると考えられる。

次にゲル微粒子凝集体のヤング率を簡易的に押し込み試験により推定した。加熱冷却処理を行っていない場合で 100 Pa 程度だったものが、加熱冷却処理を 5 回行うと 1 kPa 程度にまで上昇した。これは、加熱冷却処理により収縮と弛緩を繰り返した結果、ゲル微粒子間の間隙が埋まり密着度合いが向上した結果だと考えられる。

(5) 凝集体の形状制御

造形に向けて、任意形状のゲル微粒子凝集体形成には、その形状を予測できるシステムが必要であるという考えから、凝集シミュレーション系を構築した。有限要素解析により得られた磁束密度分布に基づき、磁力および重力を設定し粒子凝集をシミュレートするプログラムを JAVA により作成した。特に、市販の有限要素解析ソフトでは慣性項を考慮するため計算量が多くなるが、慣性項を無視することで処理速度を向上した。そして、その代わりに、粒子間の重なりを考慮した。これは、単純に粒子が重なった場合は、その逆方向に重なった距離を 1 time step で移動する速度を与えることで行った。その結果、各種パラメータ (粒子サイズ等) を調整することで、図 4 に示すように棒形状の凝集体形成について、実験結果と一致するシミュレーションを行えるようになった。

次に、U 字形状にゲル微粒子を凝集させるための磁場を発生させるための磁石アレイについて検討した。有限要素解析により得られる磁束密度分布を基に考察したところ、ネオジウム磁石と磁性体である SUS430 板を加工し組み合わせることで、ほぼ U 字形状へ凝集させられることが予想出来たため、この磁石アレイについて、上記のプログラムを用いて評価したところ、その有用性が確認できた。そこで、ゲル微粒子を用いた凝集実験を行い、U 字形状へのゲル微粒子凝集に成功した (図 5)。

(6) 局所加熱系の構築

ゲル微粒子凝集体を局所的にレーザー照射により加熱するシステムを構築した。近赤外ファイバーレーザーを対物レンズにより集光することで、スポット径が数十マイクロメートルまで絞られることを確認した。そして、水溶液やゲル微粒子凝集体に照射し、加熱できることを確認した。

(7) 今後の展望

本研究では、電荷によるゲル微粒子凝集を利用することで、従来の光硬化剤に依存しない 3 次元造形技術を提案し実証した。また、ゲル微粒子に NIPAm 骨格を含めることで、温度応答性のアクチュエータと機能することも確認した。本手法は、非接触で細胞毒性がほぼないことから、微小空間における細胞等をターゲットとした Organ-on-chip におけるソフトアクチュエータの造形に有用だろう。

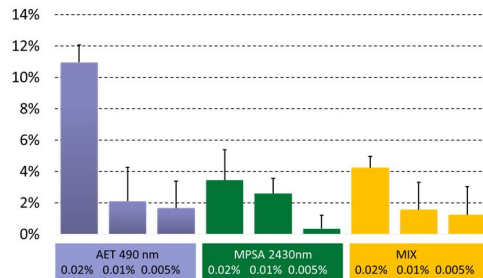


図 2 ゲル微粒子の細胞毒性評価。

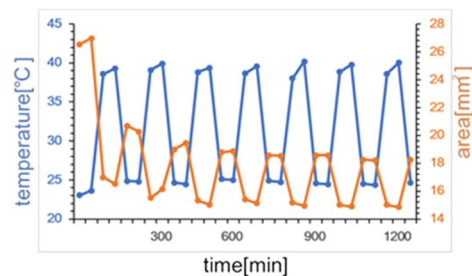


図 3 加熱冷却に伴う凝集体の面積変化。

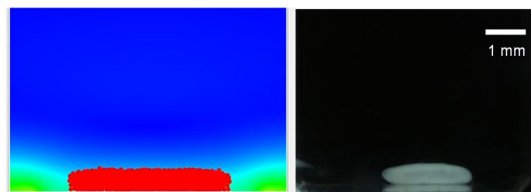


図 4 シミュレーション(左)と実験結果(右)。



図 5 U 字形状凝集体。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akiyama Yoshitake, Egawa Takatoshi, Koyano Kiyoshi, Moriwaki Hiroshi	4. 巻 304
2. 論文標題 Acoustic focusing of microplastics in microchannels: A promising continuous collection approach	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sensors and Actuators B: Chemical	6. 最初と最後の頁 127328 ~ 127328
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.snb.2019.127328	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 -
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 無
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 -
1. 著者名 Yalikuln 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 無
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 -
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 無
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 -

1. 著者名 秋山佳丈	4. 巻 62
2. 論文標題 磁気を使って細胞を任意形状に配置	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 ケミカルエンジニアリング	6. 最初と最後の頁 35-41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 秋山佳丈	4. 巻 96(39)
2. 論文標題 逆転の発想で、細胞を磁場であやつる	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生物工学	6. 最初と最後の頁 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 秋山佳丈	4. 巻 140
2. 論文標題 筋肉で動くマイクロロボット	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 電気学会誌	6. 最初と最後の頁 595 ~ 597
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1541/ieejjournal.140.595	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Akiyama Yoshitake, Nakayama Akemi, Nakano Shota, Amiya Ryuichiro, Hirose Jun	4. 巻 2021
2. 論文標題 An Electrical Stimulation Culture System for Daily Maintenance-Free Muscle Tissue Production	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cyborg and Bionic Systems	6. 最初と最後の頁 1 ~ 12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.34133/2021/9820505	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16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 秋山佳丈, 菱田豊
2. 発表標題 磁気アルキメデス効果を用いた磁気走査型細胞パターンニング
3. 学会等名 日本機械学会 , 第10回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山佳丈, 加納徹, 末永寿恵, 湊遥香, 鈴木大介
2. 発表標題 相対的反磁性ゲル微粒子凝集によるU字型マニピュレータ造形に向けた数値解析
3. 学会等名 日本機械学会 , 2019年度年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 末永寿恵, 湊遥香, 鈴木大介, 秋山佳丈
2. 発表標題 マイクロゲルアクチュエータの造形に向けたゲル微粒子凝集体の熱応答性評価
3. 学会等名 日本機械学会 , ロボティクス・メカトロニクス 講演会 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱田 豊, 秋山 佳丈
2. 発表標題 相対的反磁性を利用した任意形状 2次元細胞パターンニングに向けた磁気走査条件の検討
3. 学会等名 第19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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 H. Suenaga, H. Minato, D. Suzuki, Y. Akiyama
2. 発表標題 Aggregation of charged microgels by relatively diamagnetic assembly
3. 学会等名 29th 2018 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 菱田 豊, 秋山 佳丈
2. 発表標題 ラベルフリー反磁性細胞パターンニングにおける磁石直径と位置の影響評価
3. 学会等名 日本機械学会, 2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末永寿恵, 湊遥香, 鈴木大介, 秋山佳丈
2. 発表標題 相対的反磁性を用いたゲル微粒子の3次元造形に向けた検討
3. 学会等名 日本機械学会, 2018年度年次大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 末永寿恵, 杉原惇嗣, 秋山佳丈
2. 発表標題 疑似反磁性アセンブリによる微小構造体上への直接的3次元心筋組織の構築
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菱田豊, 秋山佳丈
2. 発表標題 磁気アルキメデス効果を用いた磁気走査型細胞パターンング 3次元磁気走査システムの構築とその評価
3. 学会等名 ロボティクス・メカトロニクス講演会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 篠瀬 真人, 秋山 佳丈
2. 発表標題 インクジェット技術を利用した細胞瞬間凍結保存法における凍結状態の評価
3. 学会等名 日本機械学会 2017年度年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 末永寿恵, 杉原惇嗣, 堀江正信, 秋山佳丈
2. 発表標題 疑似反磁性アセンブリにより構築した微小心筋組織の力学的特性の評価
3. 学会等名 第69回日本生物工学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菱田豊, 秋山佳丈
2. 発表標題 ラベルフリー磁気走査法による細胞パターンングの実証
3. 学会等名 生体医工学シンポジウム2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 菱田豊, 秋山佳丈
2. 発表標題 マイクロ流路内における疑似反磁性細胞パターンニングに向けた基礎的検討
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Suenaga, J. Sugihara, M. Horie, Y. Akiyama
2. 発表標題 Direct Bioactuator Formation on Microstructure by Quasi-diamagnetic Assembly
3. 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 遠藤佑真, 瀧澤秀世, 秋山佳丈
2. 発表標題 骨格筋細胞ゲルのモデル化に向けた基礎的検討
3. 学会等名 第18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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中野 翔太, 菱田 豊, 秋山 佳丈
2. 発表標題 磁気アルキメデス効果を用いた磁気走査型細胞描画における最適走査速度の検討
3. 学会等名 日本機械学会 2020年度年次大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 秋山佳丈	4. 発行年 2021年
2. 出版社 コロナ社	5. 総ページ数 1
3. 書名 生体筋によるバイオハイブリッドロボット（ロボット工学ハンドブック）	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 三次元造形体及びその製造方法	発明者 秋山佳丈, 鈴木大介, 湊遙香	権利者 信州大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-059892	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 大介 (Suzuki Daisuke) (90547019)	信州大学・学術研究院繊維学系・准教授 (13601)	
研究分担者	加納 徹 (Kano Toru) (40781620)	東京理科大学・工学部情報工学科・助教 (32660)	
研究分担者	小関 道彦 (Koseki Michihiko) (50334503)	信州大学・学術研究院繊維学系・教授 (13601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------