報告日：　2025 年　3 月　19 日

報告者：　東京農工大学　工学研究院・先端機械システム部門
倉科 佑太

１．　研究概要

（和文）

(1) 課題名　空気圧による細胞組織塊の高速形成アクチュエータの開発

(2) 研究者氏名、職名　倉科佑太，准教授

(3) 研究概要　本研究では，細胞組織塊（スフェロイド）の形成を高速化するために，ソフトアクチュエータの蠕動運動を利用した新たな手法を開発した．従来の方法では形成に数日かかるが，本手法では空気圧デバイスを用いて短時間で高密度のスフェロイド形成を可能とした．PDMS チャンバとマイクロウェルを改良し，空気圧を調整することで細胞の凝集を促進した．細胞観察実験では，空気圧を加えることで細胞密度が高まり，従来法より早期にスフェロイドが形成されることを確認した．

(4) キーワード　空気圧・細胞組織・アクチュエータ

（英文）

(1) Research title　Development of a Pneumatic Actuator for Rapid Cell Tissue Formation

(2) Name of researcher with title of position　Yuta Kurashina, Associate Professor

(3) Summary　This study developed a novel method using the peristaltic motion of a soft actuator to accelerate the formation of spheroids as cell aggregates. Conventional methods require several days for formation, but this method enables the rapid production of high-density spheroids using an air pressure device. By improving the PDMS chamber and microwells and adjusting air pressure, cell aggregation was promoted. Cell culture experiments confirmed that applying air pressure increased cell density, allowing spheroid formation earlier than conventional methods.

(4) Key Words　Air pressure, Cell tissue, Actuator

２．本研究の意義、特色

スフェロイドと呼ばれる細胞同士を互いに接着させた球状（直径数百 μm）の細胞組織塊は，再生医療や創薬研究において，優れた治療効果や生体機能の高い再現性などの理由から頻繁に利用されている．一方で，従来の細胞組織塊の形成方法には，細胞組織塊の形成に 3 日から 1 週間必要であった．このため，今後高まると予想される再生医療や創薬研究には大量かつ急速に細胞

組織塊を形成できる手法が求められている．そこで本研究では，ソフトアクチュエータの蠕動運動を用いることで，細胞組織塊の形成を促すことを目的とする．これにより細胞組織を高品質で高速に製作できるシステムを開発し，再生医療や創薬研究に用いることができる新たな細胞組織塊の生成手法の構築を目指す．本研究は，細胞組織形成ロボットを前半で構築し，後半では生成した球状細胞組織の状態について検討する．とくに本報では，試作した培養デバイスに空気を印加した状態，していない状態で骨芽細胞を培養し，その空気圧の印加条件を検討することで，細胞組織の凝集の度合いを比較することを目標とする．

細胞組織の生成方法はこれまで様々な手法が用いられてきた（R.-Z. Lin and H.-Y. Chang, ***Biotechnol J*** 2008）．例えば，細胞非接着の材料の鋳型の中で組織を形成する方法（A. P. Napokitano *et. al.*, BioTechniques）や液滴の表面張力で形成する方法（A. Albanese *et. al.*, ***Nat Commun*** 2013）が用いられているが，外側から外力を加えて細胞組織を形成する研究は報告されていない．一方で，倉科はこれまでに超音波の音響流（Y. Kurashina *et. al.*, ***Lab Chip*** 2017）や定在波（M. Nakao *et. al.*, ***Ultrasound Med Biol*** 2019）により細胞に圧力を加えて細胞組織を形成することで，高速で細胞を組織化することに成功した．これらの手法は発生する熱や周囲への影響から大量に培養する目的には不向きであり，臨床医とのヒアリングを踏まえた医学的な需要から本研究を着想した．

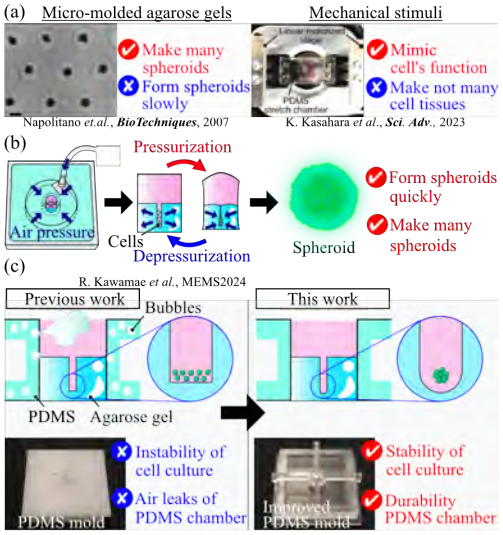


Figure 1: Concept of cell culture using a pneumatic device and micro-molded agarose gels. (a) Previous works of cell culture. (b) Conceptional illustration of culturing spheroids applying air pressure into micro-molded agarose gels. (c) Improvements from previous work to this work.

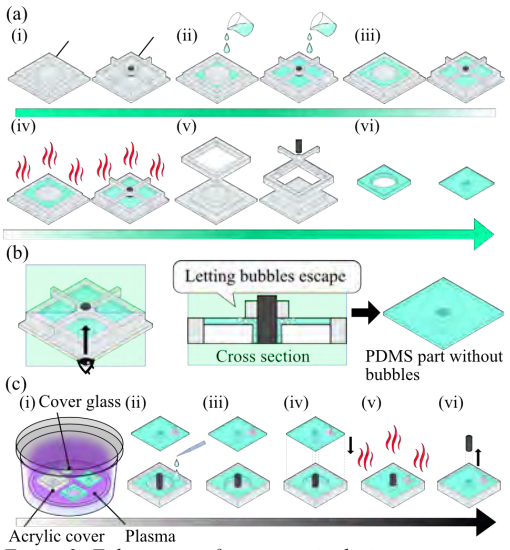


Figure 2: Fabrication of a pneumatic device. (a) Fabrication process of PDMS parts. (i) Assembling molds. (ii) Pouring PDMS into the molds. (iii) Evacuating the PDMS. (iv) Heating the PDMS. (v) Removing a pin and the molds. (vi) Finish. (b) Bonding process of the PDMS parts. (i) Plasma irradiation. (ii) Pouring PDMS between the parts. (iii) Evacuating. (iv) Bonding the PDMS parts. (v) Heating. (vi) Removing the pin.

３．実施した研究の具体的内容、結果

本研究グループでは，従来のハイドロゲルの培養チャンバに機械刺激を付与（Fig. 1a）するため，細胞組織に圧力を加える空気圧デバイスの製作を開始した[1]．しかし，これまでに製作したデバイスには，空気漏れやマイクロウェルの形状に起因する細胞組織の形成問題があった（Fig.1c）．そこで，本研究では，PDMS チャンバの新しい金型を設計し，空気圧を用いた安定した細胞培養のために最適なマイクロウェルの形状を決定した（Fig.1d）．具体的には，とくに空気漏れの発生する PDMS チャンバ上部の接続口を補強するように厚い PDMS

で十字状に形成した．この PDMS チャンバは，2 つの PDMS 部品で構成される（Fig.2a）．上部の PDMS 部品は，上記の説明のように気泡の残留を防ぎ耐久性を向上させるために交差型の金型を加えて，PDMS を脱気したのちに熱硬化させた（Fig.2b）．各パーツの PDMS を硬化後，これらの部品に再度 PDMS を塗布することで接着した（Fig.2c）．接着の際には，プラズマを照射することで，PDMS 表面の有機物を除去するとともに，表面に親水基を形成して，PDMS 同士の接着しやすさを高めた．

つぎに，細胞を播種するためのマイクロモールドであるアガロースゲルには，マイクロモールド用のステンレス製治具を用いて製作した（Fig.3a）．直径 500 μm のステンレス鋼線（Fig.3b）を 3D プリンタで製作した治具で垂直に保持した．これを金型として，ゲル化していないアガロースゲル内に挿入し，冷やすことでマイクロウェルを形成した（Fig.3c）．上記のことからマイクロウェルは，アガロース溶液を加熱・冷却することで形成した（Fig.3d）．なお，細胞が中心に集積するように先端の丸いステンレス棒を金型とすることで，アガロースゲルの穴の先端が丸いマイクロウェルを製作した．

なお，このハイドロゲル細胞デバイスを空気圧アクチュエータにより駆動するため，制御システムを製作した．マイコンでプログラミングされた電気指令を電空レギュレータが受け取り，コンプレッサで圧縮された空気をタイゴンチューブに通して，デバイスに送り込んだ．パソコンは，マイコンに電気の供給源として使用した．今回マイコンには Arduino Uno R3，電空レギュレータには ITV0030-2L を用いた．本実験では空気圧を単純に一定間隔で ON-OFF するプログラミングを使用した．電気指令の流れは，Arduino Uno に書き込まれたプログラムを DA コンバータで，デジタル信号からアナログ信号に変換し，その信号が電空レギュレータに伝わる．その信号によって，デバイスに印加される空気圧が変化することを確認した．

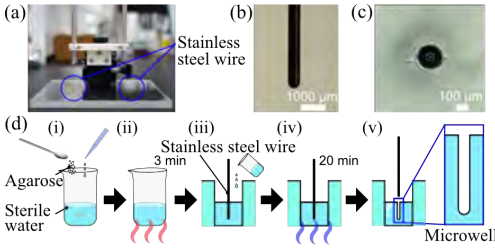


Figure 3: Fabrication of micro-molded agarose gels. (a) Micro-mold jig. (b) Tip of stainless steel wire. (c) Micro-molded agarose gel. (d) Fabrication process of micro-molded agarose gels. (i) Mixing agarose with sterile water. (ii) Heating agarose solution for 3 min by microwave. (iii) Pouring the agarose solution into a pneumatic device with a stainless steel wire. (iv) Cooling the agarose solution for 20 min. (v) Removing the stainless steel wire.

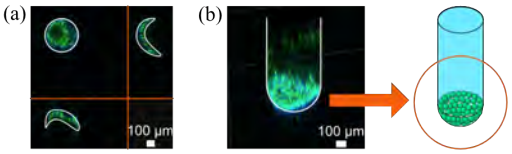


Figure 4: Cell aggregates in the condition of excessive cells. (a) Cross-sectional image of the cell aggregates. (b) 3D image of the cell aggregates in a microwell.

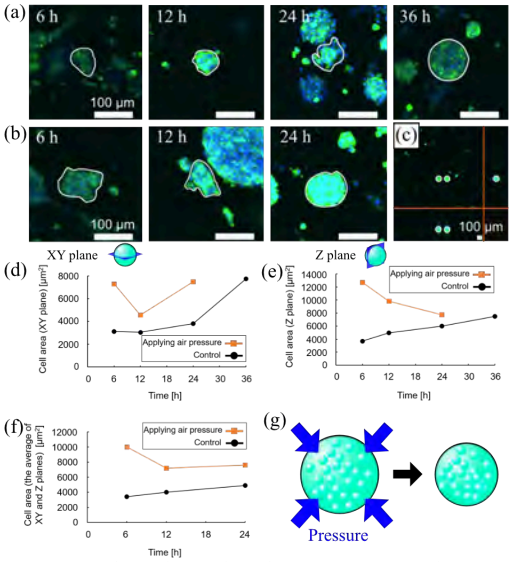


Figure 5: Spheroids incubated using pneumatic devices. (a) Spheroids incubated without air pressure. (b) Spheroids incubated by applying air pressure. (c) Cross-sectional image of spheroids incubated for 12h after applying air pressure for 12 h. (d) Cell areas of spheroids on XY plane. (e) Cell areas of spheroids on Z plane. (f) The average cell areas of XY and Z planes at each time. (g) Illustration of the pressured spheroid.

上記の装置を用いて細胞を培養した[2]. 用いた細胞は圧縮刺激により細胞組織の成熟化が期待できるマウス前駆軟骨細胞株（ATDC5）を用いた．培養条件を決定するため，ATDC5 の細胞懸濁液 20 μL（1×10^8 cells/mL）をマイクロウェルに滴下した（Fig.4a）．インキュベーション後，細胞はマイクロウェルの丸い先端部分に集積した（Fig.4b）．そこで，空気圧デバイスを用いた ATDC5 の培養は，細胞懸濁液 10 μL（1×10^8 cells/mL）の条件で実施した．細胞をマイクロウェルに播種し，6〜36 時間インキュベートした（Fig.5a, b）．空気圧を加えた細胞は，12 時間空気圧を加えた後，さらに 12 時間インキュベートした（Fig.5c）．インキュベーション後，細胞の核を Hoechst33342 および細胞の骨格（アクチンフィラメント）を Phalloidin で染色した．XY 平面上の細胞面積を比較すると，コントロールの細胞面積は増加し，空気圧を加えた細胞の面積は時間ごとに変化していた（Fig.5d）．また，Z 平面上では，コントロールの細胞面積は増加し，空気圧を加えた細胞の面積は減少していた（Fig.5e）．XY および Z 平面の平均細胞面積も，XY 平面と同様の結果を示した（Fig.5f）．すなわち，各方向からの断面を観察すると，空気圧をかけていない比較群の大きさは大きくなるのに対して，空気圧をかけた細胞はその大きさが小さくなる．すなわち，細胞同士の接着が積極的に起こり，細胞の密度が高くなったフェロイドを形成していると考えられる．以上の結果から，空気圧を用いた細胞培養は，高密度のスフェロイド形成を促進することが示唆された（Fig.5g）．

以上の結果から, 本研究で製作した空気圧アクチュエータによりハイドロゲル内で培養したマウス前駆軟骨細胞株を集積して組織化してスフェロイドを形成することを, 通常の方法と比較して早期に可能であることを示す結果を得ることができた．このため，本研究で目的としていた試作した培養デバイスに空気を印加した状態，していない状態で骨芽細胞を培養し，その空気圧の印加条件を検討することで，細胞組織の凝集の度合いを比較することができ，その有効性も確認した．

４．本研究を実施したグループに属する主な研究者の氏名、職名

倉科佑太，准教授

５．研究実施時期

2024 年　4 月　1 日から　2025 年　3 月　31 日まで

６．本研究に関連して発表した主な論文等

[1] Ryota Kawamae, Atsushi Takata, Kenjiro Takemura, and Yuta Kurashina, “Forming Spheroid Using Hydrogel Microwell and Pneumatic Soft Actuator,” The 37th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2024.

[2] Ryota Kawamae, Atsushi Takata, Kenjiro Takemura, and Yuta Kurashina, “Forming spheroids in micro-molded agarose gels using mechanical stimuli,” The 28th International Conference on

Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences–Micro-Total Analysis Systems (μTAS 2024), 2024.

７．内外における関連研究の状況

機械的な刺激の付与方法にはステッピングモーターを用いた圧縮刺激や超音波の音圧を用いた圧縮刺激が報告されてきた．一方で，本研究のようにソフトアクチュエータを用いた研究では主に引っ張りの研究が実施されてきており，本研究のようにソフトアクチュエータを用いた柔らかい圧縮刺激については初めての知見である．

８．今後の発展に対する希望

今回は単純なスフェロイドを製作することにとどまったが，さらに細胞組織はより高次なものとして分化発達させたオルガノイドの形態が挙げられる．すなわち，より高次の細胞組織を形成する研究において，本ソフトアクチュエータによる機械刺激が有効であるかを確認し，再生医療や創薬研究に用いるための細胞組織に対して有効な細胞培養手法を構築することに期待できる．