

感熱応答性ゲルを用いた微小プローブによる細胞等 マイクロ・ナノ構造体組み立て

竹内 大*

Micro-Nano Structures Assembly by Thermoresponsive Gel Probe

Masaru Takeuchi*

In this research, the probe device named “Thermoresponsive Gel (GeT) probe” we developed was applied to manipulate biological cells. The probe can handle micro objects using thermoresponsive gel generated on the probe tip. The cell viability was evaluated after handling cell spheroids by the probe inside thermoresponsive polymer solution. The mouse myoblast C₂C₁₂ cells and mouse fibroblast NIH₃T₃ cells were used to form cell spheroids. The evaluation results shows that more than 90 % cells were kept in live condition after handling by the probe. The assembly of multiple spheroids by the probe was also conducted and the results validate that the developed probe can handle cells without serious damages to cells and arbitrary pattern of cell spheroids can be constructed for tissue engineering applications.

1. 研究背景

物体を把持し、任意の場所に移動させ把持物体を置くマニピュレーション技術はロボティクス技術における最も基本的な技術の一つである。特に、産業用のロボットだけでなく、再生医療や不妊治療のために細胞など微小物体を操作するロボティクス技術が今後さらに求められるようになると考えられる。しかしながら、マクロスケールでは容易に実現できるマニピュレーション技術でも、対象物体が細胞などマイクロスケールになると、この領域特有の問題が発生しうまくなる。特に表面力の影響はマイクロスケールでは無視できず、把持、操作を行う上で大きな問題となる。これまでのデバイスでは表面力によって付着した把持物体を放すために熟練の技術が必要である場合が多く、誰もが簡便に、訓練を必要とせず使用できるデバイスの実現は困難であった。

そこで、本研究では特に水中でのマイクロマニピュレーションに着目し、特別な操作を必要とせず誰もが簡便に使用可能なマイクロマニピュレーションデバイスの実現を目指した。我々はこれまでに、図1に示すように感熱応答性ポリマー溶液を用いたプローブデバイス「感熱応答性ゲルプローブ」(参考文献(1))を開発してきた。このプローブは感熱応答性ポリマー溶液のゾル-ゲル相転移を用いて物体の把持・解放を行うことで表面力の影響を低減し、簡便かつ高い操作性を実現してきた。水中でのマイクロマニピュレーション技術は細胞など生体材料を操作する際に必要となる重要な技術であり、その応用範囲は工学だけでなく医学、生物学の基礎研究から再生医療等の応用研究まで幅広く、まさに学際的な複合工学領域の研究といえる。

2. 感熱応答性ゲルプローブによる細胞操作

本研究では、これまで開発してきた感熱応答性ゲルプローブを細胞の把持、操作へと応用することを目指す。感熱応答性ゲルプローブによる細胞操作への応用を行うにあたり、プローブ操作による細胞へのダメージの評価は最も重要な要素である。そこで、哺乳類細胞に対し作製したプローブによる操作を行い、その後に生細胞と死細胞をそれぞれ緑色、赤色

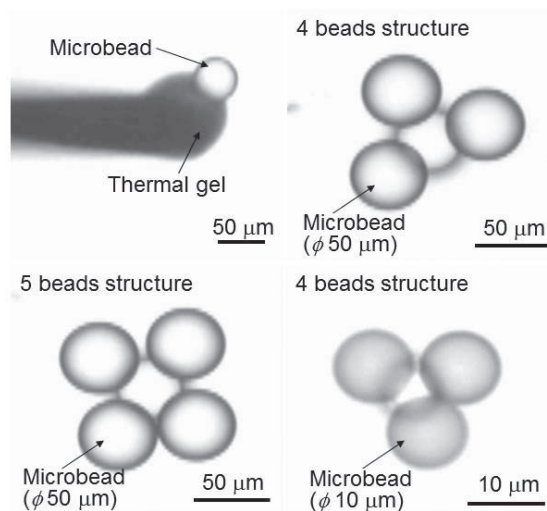


図1. 感熱応答性ゲルを用いたマイクロマニピュレーションデバイスとマイクロビーズの3次元組立結果

2015年4月8日 受理

* 豊田理研スカラー

(名古屋大学大学院工学研究科マイクロ・ナノシステム工学専攻)

の蛍光を発するよう染色できる蛍光試薬 Calcein-AM と Propidium Iodide を用いた細胞の生死判別を行った。今回の実験では、マウス筋芽細胞 $C_2C_1_2$ を用い、実験を行った。まず筋芽細胞をダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10 % の濃度でウシ胎児血清 (FBS) を加えた培養液中に分散させ、37 度、5 % CO_2 インキュベータに入れて超低接着表面フラスコ内で培養することで、球状の細胞凝集塊を作製した。この凝集塊を遠心分離により回収し、感熱応答性ゲルプローブによる把持を行うために DMEM + 10 % FBS 培養液に 10 wt% の濃度でポリイソプロピルアクリルアミド (PNIPAAm) を混ぜた溶液中に分散させた。PNIPAAm 溶液は高温でゲル、低温でゾルになる可逆性の温度応答性ポリマーの一種であり、相転移温度は約 32 度である。PNIPAAm を混ぜた培養液中に分散させた細胞凝集塊を感熱応答性ゲルプローブで把持、操作後に細胞の生死判別を行い、プローブでの把持に対する生存率への影響を調べた。

今回の実験では通常培養液 (DMEM + 10 % FBS) に入れただけの細胞凝集塊、PNIPAAm を培養液に混ぜた溶液の中に入れてだけの細胞凝集塊、PNIPAAm を培養液に混ぜた溶液の中に入れて感熱応答性プローブで把持操作を行った細胞凝集塊の 3 条件を用意した。これら各条件の細胞凝集塊に対し、Calcein-AM 及び PI の 2 種類の蛍光染色を行い、生死判別を行った。蛍光染色後の細胞凝集塊を共焦点顕微鏡により蛍光観察することで、細胞凝集塊の 3 次元像を取得した。今回の実験では、各スライス像における緑色及び赤色の面積を全スライス画像で足し合わせ、緑色及び赤色蛍光を合わせた全スライス画像の総面積に対する緑色蛍光の面積の割合を生存率として計算し、評価した。その結果、今回実験した 3 条件全てにおいて生存率が 9 割以上であり、各条件における結果に有意な差は見られなかった。このことから、感熱応答性ゲルプローブによる細胞把持は、細胞に対して大きなダメージを与えることなく行えることが示された。

3. 感熱応答性ゲルプローブによる細胞凝集塊の組み立て

感熱応答性ゲルプローブを用いて細胞凝集塊の組み立てを行った。実験ではマウス線維芽細胞 NIH3T3 の細胞凝集塊を用いた。まず、NIH3T3 を通常培養液 (DMEM + 10 % FBS) で培養後、5 mM の CellTracker Green または CellTracker Orange を含むリン酸緩衝液 (PBS) に溶液を置換してインキュベータで 30 分培養し、緑色及び橙色の 2 色に蛍光染色された細胞を用意した。この細胞を超低接着表面フラスコ内で培養することにより、緑色及び橙色蛍光を発する細胞凝集塊を作製した。

作製した 2 色の細胞凝集塊を 10 wt% 濃度で PNIPAAm を含む培養液 (DMEM + 10 % FBS) 中に分散させ、感熱応答性ゲルプローブによる把持操作によって組み立てる実験を行った。図 2 に組み立て前後の顕微鏡写真及び組み立て後の蛍光顕微鏡写真を示す。このように、感熱応答性ゲルプローブを用いることで、細胞凝集塊をハンドリングし任意形状にパターンニング可能であることを示した。

これらの研究成果は参考文献 (2) 及び (3) に示される学会にて発表し、成果の公表に努めた。

4. 結言

本研究では、我々がこれまで開発してきた感熱応答性ゲルプローブに対し、細胞凝集塊を用いて細胞の生存率を評価し、感熱応答性ゲルプローブの細胞へのダメージの有無を評価した。その結果、細胞に重大なダメージを与えることなく細胞を把持操作できることが示された。さらに、異なる蛍光染色を施した細胞凝集塊を操作することで、任意のパターンに細胞凝集塊を配置できることを示した。これらのことから、本研究により作製したプローブデバイスによって細胞等の微小物体を把持操作し、組み立てることで医学、生物学分野への応用が可能であることが示された。

REFERENCES

- (1) Masaru Takeuchi, Masahiro Nakajima, Masaru Kojima, Toshio Fukuda, Handling of micro objects using phase transition of thermoresponsive polymer, Journal of Micro-Bio Robotics, vol. 8, pp. 53-64, 2013.
- (2) 竹内大, 中島正博, 福田敏男, 感熱応答性ゲルプローブを用いたスフェロイドの 3 次元アセンブリ, ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014, 3P1-A08, 2014.
- (3) 竹内大, 中島正博, 福田敏男, 長谷川泰久, 感熱応答性ゲルによる細胞スフェロイドの組み立て, 第 32 回日本ロボット学会学術講演会, 1D2-05, 2014.

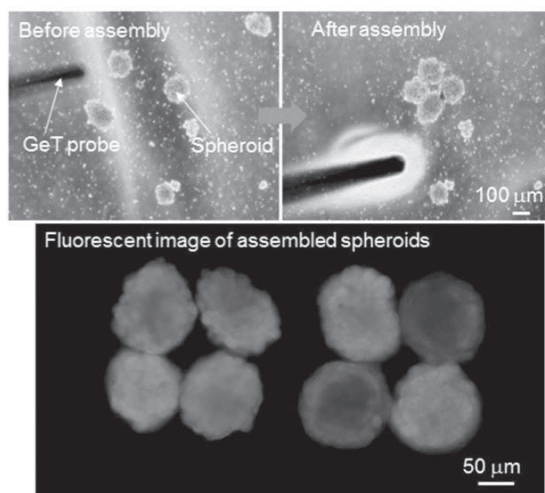


図 2. 感熱応答性ゲルプローブによる細胞凝集塊の組み立て