



Title	バイオ3D プリンタを用いたソフトロボットの実現
Author(s)	柳澤, 亮太
Citation	令和元（2019）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書. 2020
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/76000
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

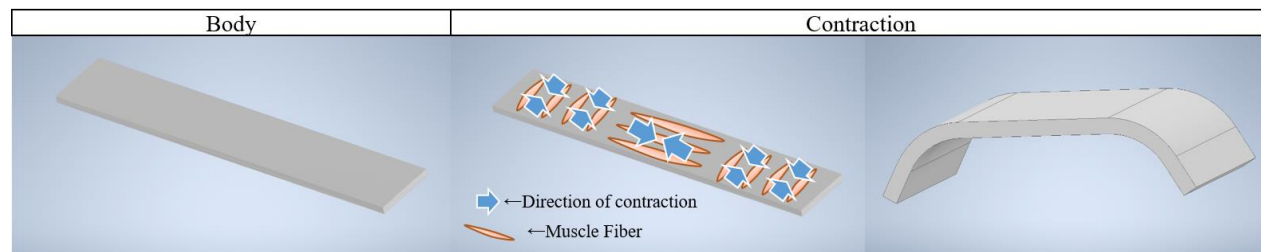
The University of Osaka

2019年度大阪大学未来基金【住野勇財団】学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな氏名	やなぎさわ りょうた 柳澤 亮太	学部 学科	基礎工学部シ ステム科学科	学年	3 年
ふりがな 共 同 研究者氏名	みなかわ なつき 皆川 夏希	学部 学科	基礎工学部シ ステム科学科	学年	3 年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	清水正宏	所属	基礎工学研究科		
研究課題名	バイオ 3D プリンタを用いたソフトロボットの実現				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				
【研究目的】 本研究では、自律的な環境適応能力を持つソフトロボットを、バイオプリンティングにより自在な形状で作成し、制御することを最終目標とする。その上で、初期段階の研究としてバイオ 3D プリンタ (CELLINK 社 BIOX) を用いて、電気刺激に応じて収縮する筋線維の組織を出力することに関する検討を行う。 現在、ロボットは精密機器の製造工場から介護の現場まで、社会の幅広い分野で活用されている。これらのロボットは人間では実現不可能な、高出力かつ高精度な作業を連続して実行することが可能である一方、設計段階で想定された環境から一旦外れると、その移行先の環境に適応することが難しいという問題を抱える。したがって、細胞がもつ環境適応性^[1]や成長能力などの機能をロボットに搭載することで、外界の変化に応じて自律的にボディを変化する能力を持つロボットを開発することができると考えられる。 【研究計画】 本研究は、コラーゲン Type-1-A (新田ゼラチン社 Cellmatrix) にマウス由来の C2C12 筋芽細胞/初代培養細胞を包埋し、バイオ 3D プリンタ (CELLINK 社 BIOX) で三次元的に出力することで、電気刺激に反応するアクチュエータの作成を行う。 【研究方法】 1. ソフトロボットの構造 提案するソフトロボットは、コラーゲンを身体とし、筋細胞を駆動源とする。そのため、筋細胞群が身体のどの部位にどの向きで分布しているかが、連続的な変形をする身体 (=コラーゲングル) の駆動能の設計のために重要となる。今回の実験では Fig. 1 に示すような長方形の形状を持つソフトロボットを出力した。このロボットの収縮方向は筋線維の方向によって決まるため、 Fig. 1 (中央)					

に示されるように 異なる配向性をもつ筋繊維を組み合わせることによって、Fig.1（右）に示すようにしなやかな動きを実現することが可能であると考えられる。

Fig.1 今回作成したロボットの形状(左)。筋繊維の向きにより力の方向が制御できる(中央)。筋繊維の向きを制御することで実現できると考えられるしなやかなロボット(右)。



2. バイオ 3D プリンタによる三次元構造のゲル出力

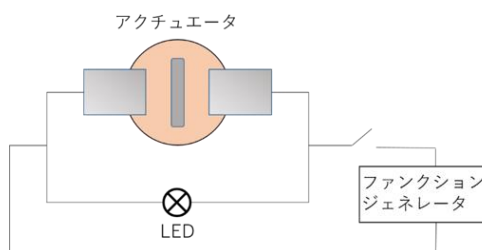
本研究では、マウス由来の C2C12 筋芽細胞と初代培養細胞の二種類の細胞を筋組織として使用している。C2C12 筋芽細胞は継代を行うことにより増殖する、比較的低コストで複数回の実験を行えるという利点を持つが、電気刺激に反応する状態まで筋管が分化するまで 2 週間程度かかる。その一方で、初代培養細胞は冷凍状態から解凍されてすぐに使用でき、かつ筋管の状態まで 1 週間程度で発達するという時間的な側面での利点を持つが、コストが C2C12 筋芽細胞に比べて高くなる。したがって、コラーゲン包埋などの条件検討の段階では C2C12 筋芽細胞を使用し、最終的な出力には初代培養細胞を使用した。

バイオ 3D プリンタでの出力には、細胞を混合させるバイオインクの種類、出力時のパラメータ（シリンジの圧力、温度、移動速度）、そして出力形状が重要となる。本研究では、細胞を混合するバイオインクとしてコラーゲングルを使用した。コラーゲンは細胞外マトリックスの主成分であり、細胞とマトリックス間の直接的または間接的なやりとりを支援することができるため、組織工学で多く使用される^[2]。通常の状態（37° C）では、コラーゲンはハイドロゲルを構成するが、機械的な変形に対して弱いため、追加の架橋が必要となる^[2]。本研究ではポリエチレンオキシド (CELLINK 社 CELLINK START) で構成された棒状の足場を作成し、その内部に事前に低温にすることで粘性を低下させたコラーゲンを出力し、出力したコラーゲンを 37° C の CO2 インキュベータで 30 分間置くことで、追加の化学的や酵素的な架橋をせずに形状を保持した。

3. アクチュエータの電気刺激

筋管は神経の活動電位に似た電気刺激を加えることで、線維方向に沿って収縮を行うことが知られている^[3]。したがって、今回の実験では矩形波と直流の 2 種類の電気刺激を加えることで、異なる電気刺激に応じた筋細胞の収縮の様子を観察した。実験系全体の写真（左）と使用した回路図（右）を Fig.2 に示す。

Fig.2 電気刺激の実験系（左）使用した電気回路（右）



上記の実験系は、電気刺激の発生装置、アクチュエータに電気刺激を加える装置、そして筋収縮を観測する位相差顕微鏡の 3 つの部分に分かれている。まず、電気刺激の発生装置としては主にファンクションジェネレータを使用した。出力波形としては、 $V_{p-p}:20V$ 、 $V_{max}:10V$ 、 $0.5Hz$ の矩形波と $V_{max}:10V$ の直流を使用している。実験に使用したファンクションジェネレータでは $V_{max}:10V$ が限界であったため、DC 電源を使うことで $V_{max}:20V$ の直流を必要に応じて使用している。

アクチュエータには、培養液入りのディッシュに浸けた幅 2cm 程度のアルミ箔電極を通して、電気刺激を筋繊維の組織に加えた。培養液は、電気刺激による収縮をより観測しやすくするために、初代細胞用分化培養メディウム（コスモバイオ社）とは異なる透明の培養液（Biological Industries 社 MEM- α ）を使用している。また、細胞の成長と動作は温度に影響されるため、透明なシート状のガラスヒータをディッシュと顕微鏡の間に置くことで CO2 インキュベーターの内部と同じ温度（ $37^{\circ}C$ ）に保っている。

細胞の動作の観察には位相差顕微鏡を使用している。電気刺激に対する細胞の収縮運動の応答性を解析しやすくするために、電気刺激のタイミングと同期した赤色 LED を発光のトリガとすることで、記録動画で電気刺激のタイミングが確認できるようにしている。

4. PIV (粒子画像流速測定法) 解析

コラーゲンに包埋された筋繊維の電気刺激による収縮速度の解析は、PIV を使用した。PIV は、時間的に連続した 2 つの粒子画像をもとに、設定領域の内部における粒子群の速度ベクトルを計測する方法である。まず、2 つの粒子画像に共通の格子点を設定し、その格子点を基準に 1 枚目の画像に検査領域、2 枚目の画像に走査領域を設定する。次に、2 枚目の走査領域から検査領域と同じ大きさの領域を取り出し、2 つの画像の相関係数を計算する。このとき、走査領域から切り出す領域の位置を 1 ピクセルずつずらすことで、走査領域全体の相関係数を計算する。最後に相関係数が最も高い位置が移動先として推定されるため、これらの情報をもとに速度ベクトルを計算する。今回の実験では、解析用のソフトとして Flownizer2D（ディテクト社）を使用した。Flownizer2D には、顕微鏡下で撮影した筋繊維の収縮動画をフレームごとに解析することで、連続的な速度ベクトルの変位を計測することができるという利点を持つため、細胞動作の記録動画の解析に適していると考えられる。

【研究成果】

Fig. 3、Fig. 4 にバイオ 3D プリンタでアクチュエータを出力した直後の写真、CO2 インキュベータで分化させた後の写真、及び電気刺激により収縮した際の PIV 解析の結果を示している。Fig. 3 では足場とコラーゲンゲルが両方バイオ 3D プリンタで出力されているのに対して、Fig. 4 ではコラーゲンゲルのみピペットで流し込んでいる。Fig. 3 と Fig. 4 はどちらも初代培養細胞を使用しており、コラーゲンゲルの細胞密度はそれぞれ $2.79 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ と $5.00 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ である。

Fig. 3 足場、コラーゲンゲルともに BIOX で出力した結果

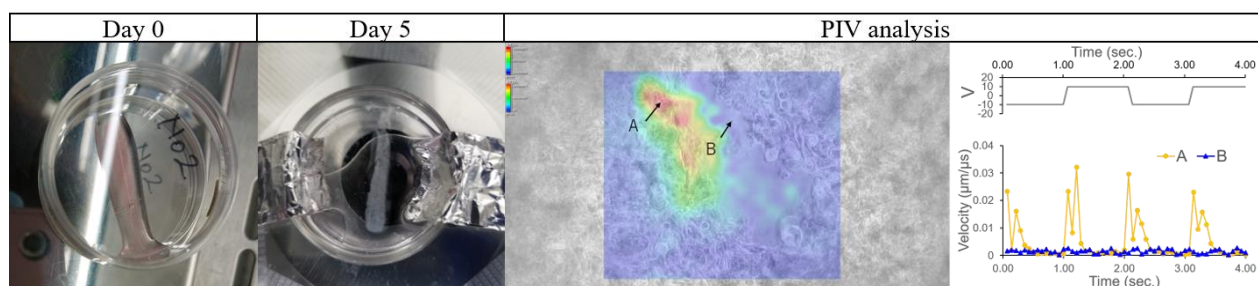
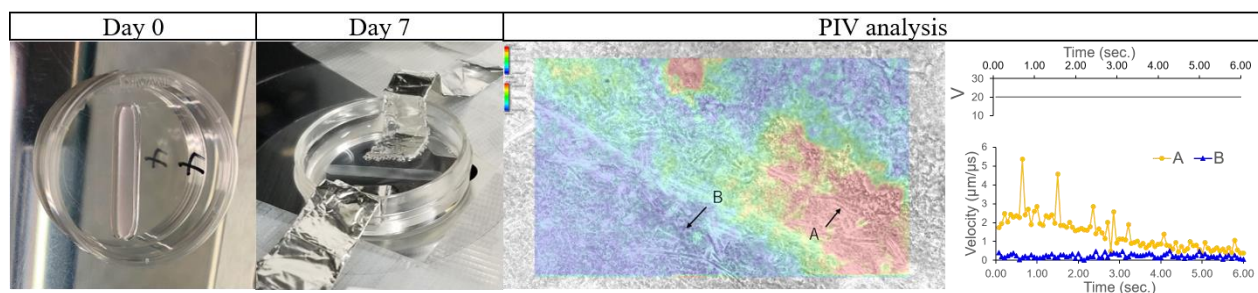


Fig. 4 足場のみコラーゲンゲルで出力した結果



【考察】

上記の実験結果より、細胞密度、収縮部位の形状、電気刺激のパターンが筋細胞の収縮に影響していると思われる。Fig. 3, 4 の収縮速度の結果を比較すると、収縮速度のピーク値が 3 のゲルより 4 のゲルのほうが 100 倍近くになっていることが確認できる。この要因として、1. 培養日数の違い、2. 両ゲルの A 点における細胞の発達具合の違い、3. 足場の中に流し込んだゲルの量の違いから発生する細胞数の違いなどが挙げられる。

考察 1

まず、4 の 4 のゲルの方が分化培養した日数が 3 のゲルよりも 2 日ほど長い。この 2 日間の違いが筋管の成長度合いに影響したものと考えられる。

考察 2

Fig4 の PIV の結果をみると、A 点付近に太く発達した筋管を複数観察することができる。一方で Fig3 の PIV の結果では、はっきりと筋管を観察することができない。考察 1 でも述べたように 4 のゲルの方が筋管の発達が進んでいたと考えられるので、A 点においても同様に、4 の方がよく発達しており、その結果大きな出力が出たと考えられる。

考察 3

Fig3 ではロボットとその形状を支える足場を全てバイオ 3D プリンタで出力している。このプリンタはゲルの出力速度と、出力時の圧力などは指定できるが、出力するゲルの総量は指定できない。そのため、4 の方が 3 よりも足場内に出力したゲルの総量が多い可能性がある。それにより同一形状のゲルではあるが、内部の細胞数に差が発生し出力にも影響が出たと考えられる。

【謝辞】

本研究の一部は JSPS 科研費 18H05467, 19K23488 の助成を受けたものです。

【参考文献】

[1] A. W. Feinberg, *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2015, 17, 243.

[2] Małgorzata K. Włodarczyk-Biegun, Aránzazu del Campo, *Biomaterials*, Volume 134, 2017, pp 180-201,

[3] Mestre, R., Patiño, T., Barceló, X., Anand, S., Pérez - Jiménez, A., Sánchez, S., *Adv. Mater. Technol.* 2019, 4, 1800631