昆虫背脈管組織を用いた長期間室温で駆動する バイオアクチュエータの創製

秋山 佳丈^{*1} 寺田 玲子^{*1} 岩淵 喜久男^{*2}
古川 勇二^{*1} 森島 圭祐^{*1}

Long-Term Durable Bioactuator without Environmental Control using Insect Heart Tissue

Yoshitake Akiyama^{*1}, Reiko Terada^{*1}, Kikuo Iwabuchi^{*2},
Yuji Furukawa^{*1} and Keisuke Morishima^{*1}

Here we propose a bioactuator using an insect dorsal vessel (heart muscle) tissue which can drive autonomously at room temperature for a long term. Living muscle cells have been attracted much interest as an actuator because a muscle tissue is totally superior to artificial muscles. Previously reported bioactuators using mammalian heart muscle cells require precise environmental control to keep cells alive and contracting. On the other hand, an insect tissue is robust compared to mammalian cells; they can grow at room temperature for a long term without medium replacement. In this paper, we succeeded in driving micropillars by the dorsal vessel tissue for more than 90 days. The strongest displacement was 23 [μm]. Based on the results of displacement, the driving force was estimated 4.7 [μN]. The definite displacements more than 10 [μm] were observed for 58 days from the 15th day to the 72nd day. Therefore, the life cycle can be calculated at 7.5×10^5 times as the average frequency was about 0.15 [Hz]. These results suggest that the insect heart tissue is more promising material for a bioactuator at room temperature compared with the other biological cell based actuators.

Key Words: Bioactuator, Insect, Long Term, Room Temperature, Bio-MEMS

1. 緒 言

マイクロマシニング技術の発達に伴い、微小な機械システムや化学システムの研究がさかに行われている。それらマイクロナノシステムの駆動要素であるアクチュエータに関する研究は、MEMS (Micro Electro Mechanical Systems) 技術を用いたトップダウン方式 [1] によるもの、もしくは、べん毛モータなどの生体分子を用いたボトムアップ方式 [2] によるもののどちらかであった。しかし、ここ数年、新たな駆動源として、生体の筋肉細胞を直接駆動源として用いた研究が行われるようになってきた。その例として、ラット心筋細胞を用いたマイクロピラー [3] [4]、マイクロポンプ [5]~[7]、その他マイクロデバイス [8]~[13] が挙げられる。

しかし、哺乳類の心筋細胞の培養および自律的収縮を維持するためには、最適環境 (37°C, pH 7.4 付近) を保ち続ける必要があり、CO₂ インキュベータを用い、なおかつ頻繁に培養液の交換を行わなければならない。そのため、デバイスの適用範囲が限定され、実用化に向けて大きな問題となっている。そこで、哺乳類や鳥類などの高等な動物と比べて、劣悪な環境において生存することができる昆虫に着目した。ショウジョウバエは、短時間ならば真空条件下でも生存し、さらにその翅にインジウムを蒸着できるといった報告 [14] や、ゴキブリ *Blaberus craniifer* の胚から摘出した心臓の断片は、培養液の中で 260 日以上拍動を続けたという報告 [15] がなされている。このように昆虫は、個体レベルだけではなく、組織や細胞の培養条件においても、高等動物と比べ生命維持に最低限必要な条件が寛容である。特に、昆虫細胞は室温において培養でき、pH の厳密なコントロールを必要とせず、培養液の交換を頻繁に行う必要がないなど、アクチュエータとして利用する際に哺乳類の細胞に比べて優位な点を持つ (Fig. 1)。

これまでの昆虫を機械と融合させた研究例として、昆虫そのものを制御しようという試み [16] や、昆虫の持つ触角の機能をフェロモンセンサとしてロボットに搭載した例 [17]~[19] はある

原稿受付 2007 年 12 月 14 日

^{*1}東京農工大学工学府機械システム工学専攻

^{*2}東京農工大学農学府生物制御科学専攻

^{*1}Department of Mechanical Systems Engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology

^{*2}Department of Bioregulation and Biointeraction, Tokyo University of Agriculture and Technology

■ 本論文は提案性で評価されました。

Fig. 1 Comparison of cell and tissue culture conditions

が、昆虫の筋肉を組織および細胞レベルにおいて、機械システムに適用しようとした試みはない。また、昆虫の組織および細胞培養に関する知見は、哺乳類のそれに関するほど得られていない。例えば、昆虫の筋肉細胞株としては、NISES-AnPe-426 [20] がこれまでに報告されている唯一の例であったが、現在は入手不能である。

我々のグループでは、昆虫の心臓である背脈管をアクチュエータとして活用すれば、耐環境性にすぐれたバイオデバイスが創製できると考え、鱗翅目昆虫の背脈管由来細胞の自律拍動に関する報告 [21] をすでに行ってきた。本稿では、背脈管組織によるマイクロピラーの駆動実験を行い、アクチュエータへの適用可能性について評価を行う。まず、第2章では、背脈管組織の拍動を維持するための培養条件および無機物への接着方法の検討を行い、デバイス化の第一段階とする。第3章では、得られたその条件下にて背脈管組織をマイクロピラーへ接着させマイクロピラーの駆動を試み、第4章にてマイクロピラーの変位や駆動期間から背脈管のアクチュエータとしての性能を評価する。第5章では他のアクチュエータとの比較を行い、背脈管アクチュエータの展望について考察し、最後に、第6章にて結論を述べる。

2. 昆虫背脈管組織の培養条件および接着方法の検討

2.1 実験に用いた昆虫およびその背脈管について

ミツモンキンウワバ *Ctenoplusia agnata* は、人工飼料 [22] にて継代飼育されたものを用いた。Fig. 2 に本研究に用いたミツモンキンウワバの最終齢幼虫の写真と、その心臓である背脈管の模式図を示す。背脈管はチューブ形状をしており、後ろから前へと順に収縮していく（蠕動運動）ことにより、体中に血リンパと呼ばれる体液を循環させている。

2.2 背脈管の培養条件の検討

鱗翅目昆虫の細胞培養用として、様々な組成の培地が考案されている。しかし、それらは、組織や細胞の長期生存および細胞株の樹立を目的としたものであり、背脈管の自律的拍動の維持に関する評価は行われていない。一方、心臓の自律的拍動を引き起こす活動電位は、イオンチャネルの相互作用により発生する [23]。したがって、培養液中の無機イオン濃度が、自律的拍動の維持には重要である [24] と考えられる。そこで、鱗翅目昆虫用に開発された塩類組成の大きく異なる3種類の培地 MGM-464 [25]、

Fig. 2 Heart of caterpillar. (a) Photograph of the final stage larva of *Ctenoplusia agnata*. The dotted line shows the position of a dorsal vessel. (b) The insect heart anatomy

Table 1 Inorganic salt composition in various media

	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
IPL-41	48.8	16.1	7.6	4.5
MGM-464	15.8	11.7	18.9	7.5
TC-100	16.5	38.5	22.5	9.0

TC-100 (Sigma-Aldrich), IPL-41 (Gibco BRL) を試した。それぞれの培地の無機イオン濃度の概算値を Table 1 に示す。それらの培地には、一般的に昆虫細胞の増殖を促進するとされている 20% 牛胎児血清および 5% 血リンパを添加した [26]。さらに、雑菌によるコンタミネーション防止のため、抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）を添加した。血リンパは、ミツモンキンウワバ最終齢幼虫から採取したものを、56°C で 30 分熱処理してから用いた。

背脈管は、幼虫の表面を 70% エタノールで洗浄・消毒後、実体顕微鏡下で摘出された。その後、培地にて十分に洗浄し、はさみで数回切り刻んだ後、培養液を交換することなく 25°C で培養された。細胞表面は、マイナスにチャージしているため、培養ディッシュの表面をプラスに帯電させることにより、細胞の接着性を改善させることができる [27]。そこで、本研究においても接着性をあげるため、表面をアンモニアプラズマにて処理した初代培養用ディッシュ“プライマリア” (Falcon) を用いた。

培地の評価は、拍動の持続性および組織の接着性の二つの観点から行われた。その結果を Table 2 に示す。まず、拍動の持続性を 30 日後に評価した。ただし、一部の摘出直後からまったく拍動しない背脈管は評価から外した。IPL-41 培地、TC-100 培地ともに、ほとんどの背脈管が自律的拍動を継続していたが、MGM-464 培地においては拍動を停止しているものがいくつか観察された。次に、背脈管組織の接着性から評価した。IPL-41 培地において、組織の接着は、60 日経ってもほとんど見られなかったが、MGM-464 培地および TC-100 培地においては、1

週間前後から、一部の組織がディッシュ底面に接着している様子が観察された。また、そこから細胞が遊走し、自立的に拍動する様子が観察された。したがって、ミツモンキンウワバの背脈管組織および由来細胞培養には、TC-100 培地が適していると結論付け、また以後の実験では、本実験と同様に、TC-100 培地に牛胎児血清、血リンパ、抗生物質を添加したものをを用いた。

2.3 背脈管組織の接着法の検討

背脈管組織を、デバイスとして活用するためには、無機物に接着させる必要がある。しかし、昆虫細胞のためのコーティングに関する知見はあまり得られていない。そこで培養条件検討に用いた初代培養用ディッシュ“プライマリア”と、一般の細胞培養ディッシュ、コラーゲンタイプIVコート、CellTak コート（ムラサキガイの接着タンパク、BD Biosciences）を、接着性において比較した。

一般の細胞培養ディッシュでは、プライマリアと比べて、背脈管組織の接着は、ほとんど見られなかった。コラーゲンタイプIVコートにおいては、プライマリア同様、播種直後の接着は見られなかったが、1週間程度培養するにつれて一部組織の接着が見られ、さらにそこから細胞が遊走する様子が観察された。CellTakにおいては、播種直後から組織が接着し、そこから細胞が遊走し、さらに接着した組織や遊走した細胞が活発に拍動する様子が観察された（Fig. 3）。これらの検討の結果、コーティングとしては、CellTak が適していることが分かった。

2.4 背脈管組織のデバイス化に適した条件

以上で得られた結果をまとめて、デバイスとして背脈管を活

用するためには、コーティングとしては CellTak が、培養液としては、TC-100 培地に 20%牛胎児血清、5%血リンパおよび抗生物質（ペニシリン、ストレプトマイシン）を添加したものが適していることが分かった。したがって、これらの条件を用いて、背脈管組織によるマイクロピラーの駆動実験を行った。

3. マイクロピラーアクチュエータの創製

3.1 マイクロピラーアレイの作製

本研究では、背脈管を組織レベルで用いるため、一般に細胞に用いられるもの（数十 μm ）より大きなピラーが必要であると考え、直径 100 μm 、高さ 1,000 μm のマイクロピラーが、200 μm 間隔で、縦 11 本 $\times$ 横 11 本の計 121 本並んだアレイを設計した。生体適合性の高さから、その素材には PDMS:poly(dimethylsiloxane) を用いた。マイクロピラーアレイの作製方法を Fig. 4 に示す。まず、厚さ 1 mm の PTFE:poly(tetrafluoro ethylene) シートに、機械加工により直径 100 μm の貫通穴をあけ、モールドを作製した。次に、そこに PDMS を流し込み、90°C で 30 分ベークし硬化させ、その後ゆっくりと剥がすことにより、マイクロピラーアレイを作製した。

3.2 背脈管組織のマイクロピラーアレイへのアセンブリ

背脈管をアセンブリする前に、クイックコート（SC-701、サンヨー電子）を用いて親水化後、CellTak をコーティングした。そこに、摘出した背脈管を播種し、25°C で培養した。その後、培養液の交換は一切行わなかった。

Table 2 Dorsal vessel tissue culture in various media

	Spontaneous Contracting Period	Tissue Adhesion
IPL-41	○	×
MGM-464	△	○
TC-100	○	○

Fig. 3 Micrograph of a dorsal vessel tissue attaching to the surface coated with CellTak after 7 days culture. The dorsal vessel tissue and the migrated cells were beating autonomously for more than 30 days

Fig. 4 Fabrication procedure for micropillar array. (a) The array was fabricated by molding with a PTFE mold. Uncured PDMS was poured onto the mold and peeled off after baking for 30 [min] at 90°C. (b) The scanning electron microscope SEM image of micropillars. The height and diameter are 1,000 μm and 100 μm respectively

4. マイクロピラーアクチュエータの評価

4.1 背脈管によるマイクロピラーの駆動

培養2日目の背脈管組織とマイクロピラーの実際の写真および42日目の最も変形しているピラーの様子を Fig. 5 に示す。マイクロピラーは、真上から実体顕微鏡 (MVX10, オリンパス) にて観察された。一つの背脈管組織によって、組織に隣接する複数のピラーが駆動された。その中でも特に点線で囲まれたピラーが、最も激しく駆動されていた。白い矢印は、そのピラーの変位方向を示す。次に、背脈管によるピラー駆動の経時変化を評価するため、同一のピラーを、14日もしくはそれ以下の間隔で観察した。その結果、このピラーの変位は、2日目から91日目まで観察された。100日目に観察した際には、背脈管の拍動が停止していたため、ピラーの変位は観察されなかった。したがって、背脈管組織により、25°Cにおいて、培養液の交換することなく、90日以上マイクロピラーを駆動し続けることができることが確認された。

4.2 マイクロピラーの変位の画像解析方法

背脈管組織のアクチュエータとしての性能を評価するため、マイクロピラーの頂点の重心の位置の変化を画像解析ソフト “Scion Image” (Scion Corp.) [28] を用いて算出した。まず、CCD カメラから PC に DV フォーマット (30 [fps]) で取り込んだ動画を、256 色グレースケールに変換した。次に、それぞれ画像において、閾値を設定することにより、マイクロピラーの頂点の形状を認識させ、その重心の座標を算出した [29]。そして、その重心座標を元に、ピラー頂点の変位の絶対値を求めた。

4.3 マイクロピラーの変位の解析結果

背脈管組織によるそれぞれの日における 30 秒間のマイクロピラー駆動の解析結果をまとめたグラフを Fig. 6 に示す。培養2日目には、変位が 2 [μm] 以下で約 2 [Hz] の小さく早い駆動と

変位が 5 [μm] 以下で約 0.2 [Hz] の大きく遅い駆動の 2 種類が観察されたが、前者は、2, 3 日で停止した。後者は、周波数は、約 0.15 [Hz] と少し減少したものの、日数が経つに連れて大きくなり、42 日目に最大変位 23 [μm] を記録した。その後、86 日

Fig. 5 Actuation of micropillars. (a) Actual image of micropillars with insect dorsal vessel tissues on the 2nd day. Most micropillars nearby the tissues are actuated and the one surrounded by the dotted circle was actuated most strongly. The arrow in white shows the actuating direction. (b) The micrographs of the relaxing and contracting micropillars on the 42nd day. The strongest displacement was 23 [μm]

Fig. 6 Time course of micropillar actuation by dorsal vessel tissue. The actuation was observed for more than 90 days from the 2nd day to the 91st day. The strongest displacement 23 [μm] through the experiment was observed on the 42nd day. The definite displacements over 10 [μm] were observed for 58 days from the 17th day to the 72nd day

目には平均 5 [μm] 程度, 91 日目には 平均 3 [μm] 程度となり, 100 日目には, まったく変位は観察されなくなった.

4.4 背脈管によるマイクロピラー駆動寿命の概算

背脈管によるピラーの駆動回数は, 90 日間 0.15 [Hz] で動き続けたとして, 1.2×10^6 回と概算できる. また, 10 [μm] 以上の大きな変位は, 17 日目から 72 日目までの 58 日間見られた. したがって, 10 [μm] 以上の駆動回数は, 同様に 7.5×10^5 回と概算される.

4.5 背脈管による駆動力の概算

背脈管組織のアクチュエータとしての性能を, 他のバイオ駆動源であるラット心筋細胞と比較するために, マイクロピラーの頂点の変位量から, 背脈管組織によりピラーにかかる力を概算した. そのためには, 背脈管組織のピラーへ接着している位置を計測する必要がある. そこで, 組織を 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液 (和光純薬) にて固定後, 走査型電子顕微鏡で観察することにより, 背脈管組織のマイクロピラーへの接着位置を計測した. その結果, 底面から約 370 [μm] のところに接着していることが確認された (Fig. 7). したがって, 微小変形であるため, マイクロピラーをフック弾性体であると仮定すると, 背脈管接着部より下の変形 D_1 および上の変形 D_2 は,

$$D_1 = \frac{PX^3}{3EI}, \quad D_2 = (L - X) \sin \left(\frac{PX^2}{2EI} \right) \quad (1)$$

となる. ただし, P は背脈管の駆動力, X は背脈管の接着位置の底面からの距離 0.37 [mm], E をピラー材料のヤング率 2.5 [MPa] [30], I を断面 2 次モーメント ($\pi d^4/64$, d = ピラーの半径 0.05 [mm]), L をピラーの高さ 1 [mm]. ここで, たわみ角 θ は微小なので $\sin \theta$ を θ で近似し, ピラーの変位 D は D_1 と D_2 を合わせたものであるから, これらを合わせて変形すると,

$$P = \frac{6EID}{X^2(3L - X)} \quad (2)$$

が得られる. 式 (2) に上記のパラメータを代入すると, 背脈管による駆動力 P は 4.7 [μN] と概算される.

Fig. 7 Estimation of Contracting Force. (a) SEM image of micropillars with insect dorsal vessel. The height of the attaching point was 0.37 [mm]. (b) Parameters to estimate the driving force by the dorsal vessel tissue

5. 考 察

5.1 ラット心筋細胞との比較

現在, バイオアクチュエータとして最も有力な候補であり, マイクロポンプなどデバイス化した報告例のあるラットの心筋細胞と比較を行った. 本研究と同様に, ラット心筋細胞によるマイクロピラーの駆動実験から, 約 3.5 [μN] の力でピラーを駆動することができるという報告がなされている [4]. また, ラット心筋細胞によって, 最も長期間駆動された PDMS 製カンチレバーは, 1 [Hz] で 6 日間駆動されたと報告されている [11] ので, 駆動寿命は 5.2×10^5 と概算することができる. 本研究において求められた背脈管組織の性能 (駆動力 4.7 [μN], 駆動寿命 7.5×10^5) は, これらの値を上回った. またラット心筋細胞が, 2, 3 日おきに培養液の交換を必要とし, さらに CO_2 インキュベータ内でしか生存することができないのに対して, 背脈管組織は, 25°C すなわちほぼ室温で, なおかつ 90 日以上培養液の交換なしで動き続けた.

唯一, 周波数という点において, 背脈管細胞が心筋細胞を下回った. しかし, 鱗翅目昆虫である *Manduca sexta* の幼虫の心拍数は, 気温が 20°C から 30°C へと上昇した場合, 1 分間当たり約 30 回から約 60 回へと上昇し, また逆に, 10°C に下降した場合においても, 約 20 回程度の拍動を維持することが報告されている [31]. この報告は, 個体レベルであるため, 様々な神経系の制御も考えられるが, 温度を上昇させることにより, 心筋細胞同等の周波数で駆動する可能性を示している.

これらの結果より, 背脈管組織は, ラット心筋細胞よりアクチュエータに適していると考えられ, メンテナンスフリーでなおかつ長期間室温で作動し続けるバイオデバイスが創製できる可能性を示している.

5.2 人工アクチュエータとの比較

一般に生体組織は, 従来の機械部品に比べ, 信頼性に欠け寿命が短いという欠点が挙げられる. しかし, 従来のアクチュエータの寿命は, ピエゾ: 10^6 から 10^8 回, 形状記憶合金: 10^5 回, ポリマー: 10^5 回以上 [32] だと報告されており, 本研究で得られた 7.5×10^5 回という値は, それらと比べても遜色がない. しかし, 信頼性に関しては, 生体組織であるため依然として問題を残しており, 摘出する幼虫の個体差やハンドリングによるダメージにより性能にばらつきが見られた. しかしながら, 昆虫背脈管組織は, 化石燃料や電気エネルギーを必要とせず, 培養液中のグルコースなどの化学エネルギーのみで駆動する点において, 従来のアクチュエータと比べてはるかに優れており, 実用的な室温で動作する環境負荷の低いデバイスを創製できる可能性を示すことができた.

5.3 今後の課題

今後, 実際にデバイスとして応用するためには, 狙ったサイズの大きさに背脈管細胞を加工し, 設計値通りの収縮力すなわち出力にしなければならない. また, 背脈管の自律的収縮を外部から制御する必要も出てくる.

まず, サイズをコントロールするためには, 背脈管を組織としてではなく, ラット心筋細胞同様に, 細胞レベルまで解離してから, 温度応答性ポリマーである *N*-イソプロピルアクリル

アミド (NIPAAm) を用いてシート化する方法が適していると考えられる [33]. そこで, 我々のグループでは, 現在, 昆虫細胞用に下限臨界溶液温度 (lower critical solution temperature) の低い NIPAAm を合成し, 昆虫細胞シートの作製に関する研究を行っている [34]. 次に, 出力を向上させるには, この昆虫細胞シートを積層させる方法が考えられる. しかし, 再生医療において, 哺乳類の細胞シートを積層する際に, 栄養分の供給や老廃物の代謝のための毛細血管の再生が困難であることが問題となっている [35]. 幸いなことに, 昆虫は毛細血管を持たない開放血管系であるため, 細胞シートの積層が容易に達成できる可能性がある. したがって, もし昆虫背脈管細胞シートが実現すれば, 必要なサイズのシートを積層することにより, 所望のサイズで出力の昆虫細胞アクチュエータが得られる.

また, 収縮の制御に関しては, 電気刺激による制御がまず考えられるが, 細胞に対して, 電気刺激による直接的ダメージおよび, 電気分解により生成する塩素などによる間接的ダメージが考えられる. そこで, 我々は, 薬剤による制御を検討している. 特に, プロクトリンおよび Crustacean cardioactive peptide (CCAP) を添加することにより, 昆虫背脈管の周波数を増加させることができ, さらには, 高濃度のプロクトリンにより, 収縮状態を維持できると報告されている [36] [37]. このように, ホルモン等などの生理活性物質により, 制御を行うことで, より生体細胞を利用するメリットを活かすことができる.

しかし, 一般に昆虫の生体組織は消化酵素に弱く, 哺乳類の細胞解離の場合と同濃度のトリプシンやコラゲナーゼの使用は, 昆虫細胞に大きなダメージを与える. したがって, 昆虫背脈管組織およびその由来細胞の培養方法に関する基礎的研究もさらに必要となるだろう.

6. 結 論

本研究では, 昆虫の心臓である背脈管組織を用いて, 室温で長期間駆動するアクチュエータへの創製可能性について評価を行った. まず背脈管由来細胞の培養の条件を検討し, 培養液には, TC-100 + 20% 牛胎児血清 + 5% 血リンパ + 抗背物質が適しており, さらに CellTak をコートすることにより無機物と効率よく接着できることが分かった. 次に, この条件を用いて, 背脈管組織をマイクロピラーに接着させ, 実際に駆動することに成功した. 背脈管によるマイクロピラーの駆動は, 培養液を交換することなく, 25°C で 90 日以上続いた. このように, 哺乳類細胞と比べて培養が容易である点や, 初めに供給された培地中に含まれる化学エネルギーのみで長期間駆動できる点は, アクチュエータとして応用する際に, 非常に有用であると考えられる. また, マイクロピラーの頂点の最大変位は, 23 [μm] であり, そこから概算される駆動力は, 4.7 [μN] であった. これらの結果は, すでにバイオアクチュエータとして報告例があるラット心筋細胞に比べて優れている. また, 駆動寿命は, 7.5×10^5 以上と概算され, 従来の人工アクチュエータと比べてもあまり劣らない. 本研究により, 昆虫由来の組織や細胞を用いることにより, 長期間, 外部制御デバイスによる温度管理の必要なく, 自律的に駆動するデバイスを創製できる可能性が示された.

謝 辞 本研究の一部は, 文部科学省の科学研究費補助金, 特

定領域研究「ブレイクスルーを生み出す次世代アクチュエータ」, 「マルチスケール操作によるシステム細胞工学」, NEDO 産業技術研究助成事業および笹川科学研究助成により行われた. また, 昆虫の組織および細胞培養に関して有益なご助言をいただいた三橋淳博士 (元: 東京農工大学教授), 今西重雄博士 (農業生物資源研究所), 供試虫を提供してくださった宇賀大祐氏 (東京農工大学岩淵研究室) に心より感謝を申し上げます.

参 考 文 献

- [1] M.J. Madou: "Fundamentals of Microfabrication," The Science of Miniaturization, pp.379-465, Crc Pr I Llc, 2002.
- [2] 上田太郎: "蛋白質分子モーターとそのナノアクチュエータとしての利用", FED Review, vol.2, no.11, pp.1-17, 2003.
- [3] K. Morishima, Y. Tanaka, M. Ebara, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori: "Demonstration of a bio-microactuator powered by cultured cardiomyocytes coupled to hydrogel micropillars," Sens. Act. B, vol.119, no.1, pp.345-350, 2006.
- [4] Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori: "Demonstration of a PDMS-based bio-microactuator using cultured cardiomyocytes to drive polymer micropillars," Lab Chip, vol.6, no.2, pp.230-235, 2006.
- [5] Y. Tanaka, K. Morishima, T. Shimizu, A. Kikuchi, M. Yamato, T. Okano, and T. Kitamori: "An actuated pump on-chip powered by cultured cardiomyocytes," Lab Chip, vol.6, no.3, pp.362-368, 2006.
- [6] Y. Tanaka, K. Sato, T. Shimizu, M. Yamato, T. Okano and T. Kitamori: "A micro-spherical heart pump powered by cultured cardiomyocytes," Lab Chip, vol.7, no.2, pp.207-212, 2007.
- [7] J. Park, I.C. Kim, J. Baek, M. Cha, J. Kim, S. Park, J. Lee and B. Kim: "Micro pumping with cardiomyocyte?polymer hybrid," Lab Chip, vol.7, no.11, pp.1367-1370, 2007.
- [8] J. Xi, J.J. Schmidt and C.D. Montemagno: "Self-assembled microdevices driven by muscle," Nat. Mater., vol.4, no.2, pp.180-184, 2005.
- [9] A.W. Feinberg, A. Feigel, S.S. Shevkoplyas, S. Sheehy, G.M. Whitesides and K.K. Parker: "Muscular Thin Films for Building Actuators and Powering Devices," Science, vol.317, no.5843, pp.1366-1370, 2007.
- [10] D.H. Kim, J.Y. Park, K.Y. Suh, P. Kim, S.K. Choi, S.C. Ryu, S.H. Park, S.H. Lee and B. Kim: "Fabrication of patterned micro-muscles with high activity for powering biohybrid microdevices," Sens. Act. B, vol.117, no.2, pp.391-400, 2006.
- [11] J. Kim, J. Park, S. Yang, J. Baek, B. Kim, S.H. Lee, E. Yoon, K. Chun and S. Park: "Establishment of a fabrication method for a long-term actuated hybrid cell robot," Lab Chip, vol.7, no.11, pp.1504-1508, 2007.
- [12] 石坂, 佐藤, 森島: "心臓の拍動エネルギーを電気エネルギーに変換するバイオニック発電素子の開発", 日本ロボット学会第 25 回学術講演会予稿集 CD-ROM, 3I21, 2007.
- [13] Y. Akiyama, Y. Furukawa and K. Morishima: "Controllable bio-microactuator powered by muscle cells," Proc. of Int. Conf. IEEE Eng. Med. Biol. Soc., pp.6565-6568, 2006.
- [14] A.J. Shum and B.A. Parviz: "Vacuum microfabrication on live fruit fly," Proc. of Int. Conf. IEEE MEMS, pp.179-182, 2007.
- [15] W. Larsen: "The maintenance of embryonic cockroach heart fragments in vitro," Life Sciences, vol.8, pp.606-610, 1963.
- [16] R. Holzer and I. Shimoyama: "Locomotion control of a bio-robotic system via electric stimulation," Proc. of Int. Conf. IEEE/IROS, pp.1514-1519, 1997.
- [17] Y. Kuwana, S. Nagasawa, I. Shimoyama and R. Kanzaki: "Synthesis of silkworm moth's pheromone-oriented behavior by a mobile robot with moth's antennae as pheromone sensors," Biosens. Bioelectron., vol.14, no.2, pp.195-202, 1999.

- [18] Y. Kuwana and I. Shimoyama: "A Pheromone-Guided Mobile Robot that Behaves like a Silkworm Moth with Living Antennae as Pheromone Sensors," Int. J. Rob. Res., vol.17, no.9, pp.924-933, 1998.
- [19] 長澤, 桑名, 下山, 神崎: "小型フェロモントレースロボットの研究", 日本ロボット学会第15回学術講演会予稿集, pp.481-482, 1997.
- [20] H. Inoue, J. Kobayashi, H. Kawakita, J.I. Miyazaki and T. Hirabayashi: "Insect muscle cell line forms contractile tissue networks in vitro," In Vitro Cell. Dev. Biol., vol.27A, no.11, pp.837-840, 1991.
- [21] Y. Akiyama, K. Iwabuchi, Y. Furukawa and K. Morishima: "Culture of insect cells contracting spontaneously; research moving toward an environmentally robust hybrid robotic system," J. Biotech., vol.133, pp.261-266, 2008.
- [22] 川崎, 池内, 日高: "飼料交換を要しないミツモンキンウバの室内飼育法", 応動昆, vol.31, pp.78-80, 1987.
- [23] 岡本: 心臓のフィジオーム, pp.64-121, 森北出版株式会社, 2003.
- [24] H. Ai, K. Kuwasawa, T. Yazawa, M. Kurokawa, M. Shimoda and K. Kiguchi: "A physiological saline for lepidopterous insects: effects of ionic composition on heart beat and neuromuscular transmission," J. Insect Physiol., vol.41, pp.571-580, 1995.
- [25] J. Mitsuhashi: "Development of highly nutritive culture media," In Vitro Cell Dev. Biol. Anim., vol.37, no.6, pp.330-337, 2001.
- [26] 三橋: "昆虫組織培養の現状 (1)", 植物防疫, vol.18, pp.359-366, 1964.
- [27] S. Ertel, B. Ratner and T. Horbett: "Radiofrequency plasma deposition of oxygen-containing films on polystyrene and poly(ethylene terephthalate) substrates improves endothelial cell growth," J. Biomed. Mater. Res., vol.24, pp.1637-1659, 1990.
- [28] <http://www.scioncorp.com/>
- [29] 小島, 岡本: 画像解析テキスト, pp.120-142, 羊土社, 2001.
- [30] J.L. Tan, J. Tien, D.M. Pirone, D.S. Gray, K. Bhadriraju and C.S. Chen: "Cells lying on a bed of microneedles: an approach to isolate mechanical force," Proc. Nat. Acad. Sci. USA, vol.100, no.4, pp.1484-1489, 2003.
- [31] A. Smits, W. Burggren and D. Oliveras: "Developmental changes in in vivo cardiac performance in the moth *Manduca sexta*," J. Exp. Biol., vol.203, pp.369-378, 2000.
- [32] I. W. Hunter and S. Lafontaine: "A comparison of muscle with artificial actuators," Proc. IEEE Solid-State Sensor and Actuator Workshop, pp.178-185, 1992.
- [33] T. Okano, N. Yamada, H. Sakai and Y. Sakurai: "A novel recovery system for cultured cells using plasma-treated polystyrene dishes grafted with poly(N-isopropylacrylamide)," J. Biomed. Mater. Res., vol.27, pp.1243-1251, 1993.
- [34] 佐久間, 秋山, 岩淵, 秋山, 大和, 岡野, 森島: "昆虫細胞を利用した耐環境性メカノバイオニックシステムの創製", 日本ロボット学会第25回学術講演会予稿集 CD-ROM, 2F12, 2007.
- [35] T. Shimizu, H. Sekine, Y. Isoi, M. Yamato, A. Kikuchi and T. Okano: "Long-term survival and growth of pulsatile myocardial tissue grafts engineered by the layering of cardiomyocyte sheets," Tissue Eng., vol.12, pp.499-507, 2006.
- [36] A. Ejaz and A. Lange: "Peptidergic control of the heart of the stick insect, *Baculum extrudentum*," Peptides, vol.29, pp.214-225, 2008.
- [37] K. Sláma and G. Rosiński: "Delayed pharmacological effects of proctolin and CCAP on heartbeat in pupae of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*," Physiol. Entomol., vol.30, pp.14-28, 2005.

秋山佳丈 (Yoshitake Akiyama)

2000年東京農工大学工学部生命工学科卒業。2002年マイクロ化学技研(株)研究員。2005年東京農工大学大学院工学府機械システム工学専攻博士後期課程入学。2008年日本学術振興会特別研究員。現在に至る。マイクロ化学システムおよび生体細胞のマイクロデバイスへの応用研究に従事。第22回日本ロボット学会研究奨励賞, 第29回日本比較生理生化学会発表論文賞受賞。

(日本ロボット学会正会員)

岩淵喜久男 (Kikuo Iwabuchi)

1975年千葉大学卒業。理学博士(京都大学)。2001年より東京農工大学大学院教授。現在に至る。昆虫の個体間・細胞間制御に興味を持ち、培養条件下における寄生メカニズムと細胞制御に関する研究を行っている。日本動物学会会員。

森島圭祐 (Keisuke Morishima)

1998年名古屋大学大学院工学研究科マイクロシステム工学専攻博士課程修了。1997年日本学術振興会特別研究員。1998年Stanford University博士研究員。2001年(財)神奈川科学技術アカデミー常勤研究員。2005年東京農工大学大学院工学府機械システム工学専攻助教授, 2007年東京農工大学大学院生物システム応用科学府准教授, 現在に至る。博士(工学)。Bio-MEMS, μ TAS, バイオアクチュエータの研究に従事。IEEE, 日本バイオマテリアル学会, 日本生物物理学会, 日本比較生理生化学会各会員。

(日本ロボット学会正会員)

寺田玲子 (Reiko Terada)

2002年三重大学生物資源学部生物資源学科卒業, 2003年日清マリテック(株)に入社。2007年より東京農工大学工学部機械システム工学科勤務, 現在に至る。魚類分類学に興味を持つ。

古川勇二 (Yuji Furukawa)

1968年東京都立大学工学研究科修士課程修了。博士(工学)。2003年より東京農工大学工学府機械システム工学科教授。現在の兼職: 日本学術会議会員, 東京農工大学大学院技術経営研究科(MOT)長, 東京都立大学名誉教授, (社)首都圏産業活性化協会会長, 経済産業省産業構造審議委員ほか。歴任: 精密工学会会長, 日本機械学会FA部門長ほか。精密工学会会員。