

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 30 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14195

研究課題名(和文) 水晶振動式MEMSプローブを用いた卵細胞の非侵襲活性評価への挑戦

研究課題名(英文) Challenge of Noninvasive Quality Evaluation of Oocyte Using Quartz-crystal Resonating MEMS Probe

研究代表者

新井 史人(Arai, Fumihito)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：90221051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、振動誘起流れを用いて、卵細胞の位置と姿勢を操作し、水晶振動式MEMSプローブによりその力を計測するシステムを構築した。振動誘起流れは定常流れと非定常流れの合成流であり、非定常流れの影響を解析して実験的にその影響を評価した。また、高感度、高剛性な水晶振動式MEMSプローブを設計し、水晶振動子機式が高剛性である利点を活かし、ワイドレンジの力センサを実現した。このプローブを用いて細胞凝集体を用いて、機械的特性を計測、評価した。この系では卵子に限らず、様々な細胞の力学的特性の計測に応用が可能となる。また、品質評価を旨とし、卵細胞の機械的特性から、透明帯のヤング率の変化を計測、評価した。

研究成果の概要(英文)：In this research, force sensing system of oocyte is designed and evaluated by using the quartz-crystal resonating MEMS probe. The vibration induced flow is used to control position and orientation of oocyte. The vibration induced flow is composition of steady flow and unsteady flow. The flow is investigated and the effect of unsteady flow is evaluated by analysis and experiment. Also, the quartz-crystal resonating MEMS probe is designed to have high sensitivity and high rigidity, and the force sensing probe with wide measurement range was developed. With this probe, mechanical property of the spheroid was measured and evaluated. This system is applicable to the measurement of mechanical property of different cells as well as oocyte. Moreover, based on the force measurement of oocyte, Young's modulus of zona pellucida is measured and evaluated for the quality measure.

研究分野：知能機械学・機械システム

キーワード：マイクロ・ナノデバイス 超精密計測 マイクロマシン 走査プローブ顕微鏡 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

近年、繁殖技術の発展により、優良な後継牛を確保できるようになってきた。しかしながら、搾乳牛への人工授精では受胎率は約30%程度、未経産牛においては約50%程度しかない。畜産分野においては国内で年間およそ87,000頭の受精牛に受精卵移植が実施され、24,000頭の子牛が生まれている(H24年度)。つまり、63,000個の受精卵が無駄になっている(損失約12.6億円/年。子牛市場に換算すると約250億円相当。)。また、国内のマウス等げっ歯目の年間消費数は、約1,100万匹で、遺伝子組み換えや凍結卵子販売を入れれば130億円を超える市場となっている。マウスにおいても卵子を受精させてから出産されるまでに個体数は約27%に減少するため、良質な卵子や胚を得るニーズは共通している。さらに、我国では、晩婚化、晩産化が進み、不妊治療の件数が増えている。国内の市場規模は1,000億円を超える。不妊の原因の半分は女性の卵子の老化や活性低下とも言われている。受精胚の品質判断基準で一般的なのは形状だが、主観が入る。見た目がきれいでも失敗するケースが問題である。受精胚を含む卵細胞の活性評価は重要である。

卵細胞の活性評価には、細胞質の形態、透明体の光学特性(Pol-Scopeを用いた計測。Zygote, 2006)、硬さ、呼吸活性、遺伝子などが用いられる。受精胚として利用するには、非侵襲で活性を評価する必要がある。これまで、細胞質に存在するミトコンドリアの形が、卵細胞の成熟や老化に伴い変化する仕組みが調べられている(Current Biology 2014)。しかし、蛍光染色なしにミトコンドリアを含む細胞小器官の形態を計測することは難しい。また、遺伝子解析も侵襲的となる。

これまで、受精後の時間経過にともない、硬さの変化が明確に現れることが報告されている(Human Cell, 2006)。透明体の光学特性や卵細胞の硬さは、非侵襲で計測可能であ

り、形態に加えて有用な尺度になる。従来、硬さ計測には圧電素子の接触インピーダンス変化による方式がとられているが、センサプローブの移動が計測の外乱になるため操作が限定される難点があった。また、粘性の計測には向かない。我々は、卵子の粘弾性を連続で自動計測した。計測精度は、等価ヤング率で数10 Pa以下、等価粘性係数で数10 Pa・s以下を達成した[1]。しかし、マイクロ流体チップが閉じた空間であるため、卵子の姿勢の変更が困難である問題があった。また、シリコンカンチレバーの弾性変形を利用した力計測方式[2]では、カンチレバーの剛性が低く、対象を大きく(直径の30%以上)変形させて計測する場合には、カンチレバーの変形が問題となる。

## 2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では図1に示す計測システムを提案した。つまり、本研究では、オープンチップ上で卵細胞の姿勢・位置制御を行う方式を採用し、また、水晶振動を利用して、高感度でありながら高剛性なMEMSプローブを開発する。これにより細胞の力を安定に計測するシステムを構築することを目的とする。この系では卵細胞に限らず、様々な細胞の力学的特性の計測に応用が可能となる。卵細胞に関しては、透明帯の硬さ計測の基礎データを蓄積する。

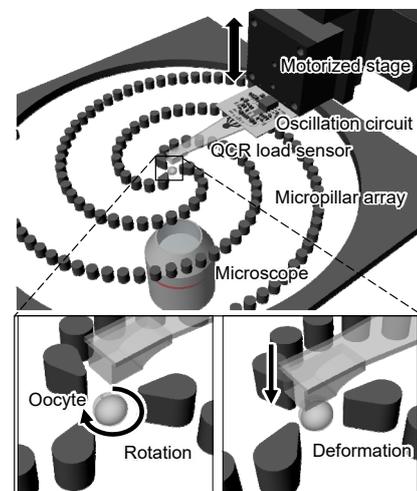


図1 計測システム概念図

### 3. 研究の方法

本研究では、上部がオープンなマイクロ流体チップ上で、細胞の機械的特性をその場計測するシステムを構築し、以下の4つの研究項目を実施した。

(1) 細胞の操作：マイクロ構造体を有する上部がオープンなマイクロ流体チップを加振し、局所流れを制御する方式を解析し、操作方法の有効性を確認した。

(2) 水晶振動式 MEMS プローブ：高感度、高剛性な水晶振動式 MEMS プローブを設計、試作し、評価した。

(3) 細胞の弾性特性の計測：プローブ先端で位置・姿勢制御した細胞を変形し、機械的特性を計測した。

(4) 細胞の活性評価：卵細胞の機械的特性から、解凍後の時間経過による卵細胞の透明帯のヤング率の変化を計測、評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 細胞の操作

液体中の微小構造体に振動を印加すると、構造体周辺に局所流が発生する。これを振動誘起流れと呼んでいる。振動誘起流れの解析として、チップ内にマイクロ構造体を配置し、チップ全体に回転振動を与え、細胞の周りの振動、流体場の解析を行った。振動誘起流れは定常流れと非定常流れの合成流であることがわかった。非定常流れは印加周波数の1倍か2倍の周波数が支配的であることが解析により確認できた。細胞操作において、印加周波数は数百 Hz 帯であり、非定常流れの影響は高い周波数帯である。実際に実験系を構築して、非定常流れの成分を高速カメラで観察した。これにより、より詳細に振動誘起流れの現象を理解することができた。この知見は、振動誘起による細胞操作方法に応用することが可能である。

また、この知見に基づいて実際にマイクロ構造体を有するチップおよび圧電素子による加振システムを構築し、顕微鏡画像から細

胞の位置・姿勢を計測し評価した。

#### (2) 水晶振動式 MEMS プローブ

水晶振動式 MEMS プローブの解析、設計に基づき、加工を行った。図2にその加工プロセスを示す。水晶基板をドライエッチングプロセスによって加工し、常温ボンディングによって接合した。

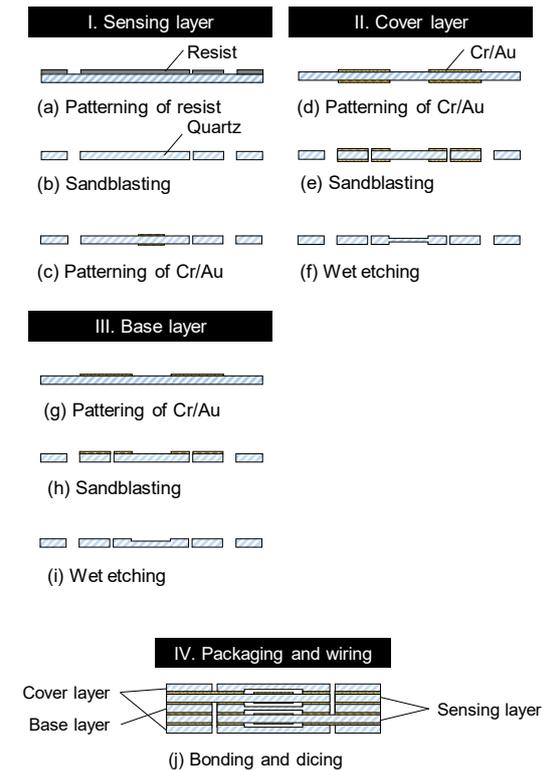


図2 水晶振動式 MEMS プローブの加工プロセス

また、プローブの温度安定性を図3に示す。プローブ先端は平滑化し、倒立顕微鏡で明視野観察できるように透明にした。プローブの力計測キャリブレーション結果を図4に示す。

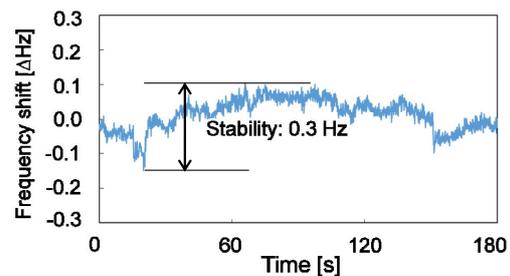


図3 水晶振動式 MEMS プローブの温度安定性

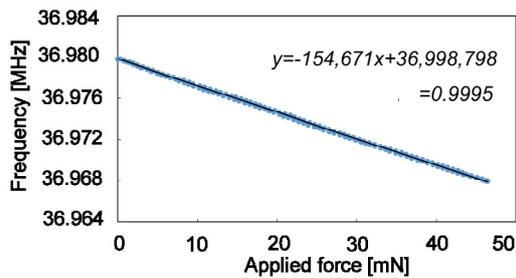


図 4 水晶振動式 MEMS プロブの力計測キャリブレーション結果

ここで、プローブの温度安定性は 0.3 Hz、プローブの感度は 154,671 Hz/N であった。計測レンジは  $2.5 \times 10^4$  となり、水晶振動子機式が高剛性である利点を活かして、ワイドレンジの力センサが実現できた。

### (3) 細胞の弾性特性の計測

細胞の位置・姿勢を調整し、水晶振動式 MEMS プロブを用いて力計測するシステムを構築した。図 5 にその外観を示す。評価実験サンプルとして、ヒト肝ガン由来細胞株である HepG2 細胞を凝集させて作製した細胞凝集体を利用した。プローブを用いてこの細胞凝集体を変形した際の、力センサの値と位置変化の様子を図 6 に示す。対象物の変形と力計測情報から、機械的特性指標を導出し評価した。細胞凝集体は培養状態によって、内部の細胞が壊死することがある。この内部状態と機械的特性に相関性が見いだせる可能性が示唆された。

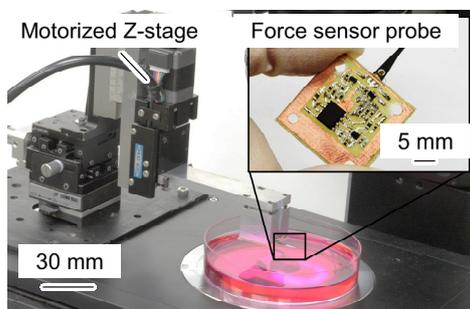


図 5 水晶振動式 MEMS プロブを用いた力計測システムの外観

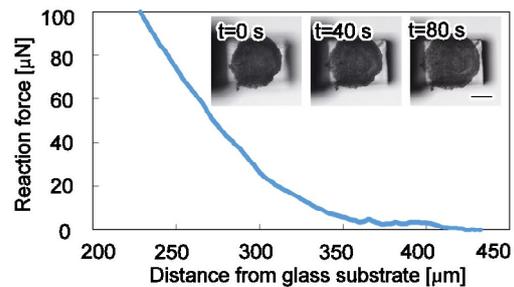


図 6 プロブを用いて細胞凝集体を変形した際のセンサの値と位置変化の関係

### (4) 細胞の活性評価

品質評価を目指し、凍結保存されたマウスの卵細胞を用いて、解凍後の時間変化により、卵細胞の透明帯の機械的特性（ヤング率）の特性がどのように変わるかを計測、評価した。尚、解凍後の卵細胞はインキュベータの中で保存し、計測時だけ、インキュベータから外に取り出して計測した。図 7 にヤング率の時間変化を示す。この結果より、解凍後に透明帯のヤング率が増加する傾向にあるという結果を得た。

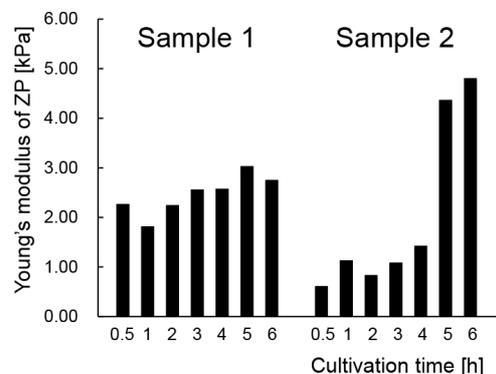


図 7 凍結保存されたマウスの卵細胞の解凍後の時間変化による透明帯のヤング率の特性変化の様子

今後は、この知見を活かして、図 5 で構築したシステムを用いて卵細胞の品質評価を行うことが課題である。卵細胞の品質との関係はまだ不明な点が多いため、今後詳細な調査が必要である。

以上に述べたように、本研究では、卵細胞の機械的特性を調べるために、振動誘起流れ

を用いて、卵細胞の位置と姿勢を操作し、水晶振動式 MEMS プローブにより力計測するシステムを構築した。振動誘起流れは定常流れと非定常流れの合成流であり、非定常流れの影響を解析して実験的にその影響を評価した。水晶振動式 MEMS プローブは、水晶振動子機式が高剛性である利点を活かして、ワイドレンジ ( $2.5 \times 10^4$ ) の力センサが実現できた。この系では卵細胞に限らず、様々な細胞の力学的特性の計測に応用が可能となる。卵細胞に関しては、様々な条件下での透明帯の硬さ計測の基礎データを蓄積する。

- (2) 研究分担者  
なし
- (3) 連携研究者  
なし
- (4) 研究協力者  
なし

#### <引用文献>

- [1] S. Sakuma and F. Arai, "Cellular Force Measurement Using a Nanometric-Probe-Integrated Microfluidic Chip with a Displacement Reduction Mechanism", J. Robotics and Mechatronics, 25-2, pp.277-284, 2013.
- [2] K. Nakahara, S. Sakuma, T. Hayakawa, F. Arai, "On-chip transportation and measurement of mechanical characteristics of oocytes in an open environment", Micromachines, 6(5), 648-659, 2015.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- [1] Ayaka Sato, Shinya Sakuma, Nobuhiko Kojima, Fumiya Tao and Fumihito Arai, "Mechanical Characterization of Spheroids by Force Sensor Probe Using Quartz Crystal Resonator", 26th IEEE Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2016), Nagoya, Japan, 2016, Nov.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

新井 史人 (ARAI, Fumihito)  
名古屋大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 90221051