

令和 4 年 9 月 8 日現在

機関番号：57103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04268

研究課題名(和文)サイバーフィジカルシステムとの統合で形式知化する次世代スマートハンドリングの革新

研究課題名(英文)Next generation smart handling innovations to be explicit knowledge through integration with Cyber-Physical Systems

研究代表者

久池井 茂(Kuchii, Shigeru)

北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・教授

研究者番号：50300653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒト細胞等の機能分析に有効なハンドリング技術の暗黙知を形式知として確立するものである。研究シーズであるレーザー光圧を用いた非接触運動制御技術・画像処理による有用物質計測技術を連携したハンドリング技術において、膨大な操作ノウハウ等の情報をサイバー空間の強力なデジタル解析で結びつけ数値化し、定量的に分析するサイバーフィジカルシステム(CPS)と融合する。従来は人でしか対応できなかった高度化・複合化した最先端の機能分析技術に貢献するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サイバーフィジカルシステム(CPS)環境の構築と非接触機能分析システムを融合し、「経験と勘」でしかわからなかった知見を引き出す研究を行った。蛍光色素を利用して、顕微鏡画像から融合細胞株のみを識別できた。細胞融合時に、ハイブリドームを効率よく識別できれば、光ピンセット技術等と組合せ、選別・培養できることにつながり、最終的な必要抗体を効率的に取得可能となる研究成果を得た。

研究成果の概要(英文)：This research is to establish tacit knowledge of handling technology effective for functional analysis of human cells as formal knowledge. In the handling technology that links non-contact motion control technology using laser light pressure and useful substance measurement technology using image processing, which are the seeds of our research, we will combine a vast amount of information such as operating know-how with powerful digital analysis in cyberspace, quantify it, and integrate it with Cyber-Physical System (CPS) that quantitatively analyzes it. This contributes to advanced and complex cutting-edge functional analysis technologies that could previously only be handled by humans.

研究分野：知能機械学・機械システム

キーワード：スマートハンドリング サイバーフィジカルシステム 回転不変マッチング 非接触制御技術 機能分析技術

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

従来は人でしかできなかった部分を自動化すれば、システム全体を最適化することができ、操作方法等ノウハウを暗黙知から形式知にすることができると考えた。そこで、現実世界の制御対象のさまざまな状態を「数値化」し、定量的に分析することで「経験と勘」でしかわからなかった知見を引き出すサイバーフィジカルシステム(CPS)を活用した。

本研究では、精緻な分析を必要とする次世代のスマートハンドリング技術を着想し、非接触運動制御技術と非接触細胞機能分析技術をCPSで統合することで課題解決を考えた。

これまでの研究でCPSの有用性を確認しており、本研究内容を実現する状況は十分に整っており、システムを導入する現場と研究段階から密に連携することで、システムの研究にフィードバックし、安定した事業化も視野に入れた産業社会への大きな貢献を図った。

(1) 近年では、対象物の微小化に伴って μm オーダーの微小物体の観測や操作を行う技術が望まれている。これを実現する方法として、2018年ノーベル物理学賞を受賞したレーザー光を用いた非接触の運動制御法(A. Ashikin et al., Opt. Lett. 11, pp. 288-290, 1986)がある。この光ピンセットと呼ばれる技術は、さまざまな産業分野でも応用範囲が急速に広がっている。

本研究では、この技術を光学顕微鏡で用いて、対物レンズにレーザー光を強く集光することによって、焦点位置に粒子を移動・捕捉する。バイオテクノロジー分野では、生体組織内の μm オーダーの細胞を生きたままに保護・移動する技術が、重要な要素技術として求められており、従来の生物学や医学を専門とする研究者の暗黙知を形式知化する必要がある。

(2) 現在、バイオテクノロジーの発展に伴い、細胞の培養技術を有用物質生産技術として利用する研究が行われている。この有用物質の生産量の計測は、機器分析が一般的である。しかし、この方法では時間や費用がかかり、細胞を破壊しないと計測できないというデメリットがある。

本研究では細胞の抗体や核を蛍光色素で染色し、蛍光顕微鏡を用いて観察することで、細胞内のさまざまな機能を画像処理技術によって分析する方法を提案する。画像処理技術を用いた細胞内の有用物質の新たな計測方法である。この方法により、蛍光顕微鏡で撮影された画像の輝度を測定することで細胞内有用物質を測定できる。細胞の連続断面画像を取得することで3次元化と細胞全体の機能情報が取得できる。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト細胞等の機能分析に有効なハンドリング技術の暗黙知を形式知として確立するものである。研究シーズであるレーザー光圧を用いた非接触運動制御技術・画像処理による有用物質計測技術を連携したハンドリング技術において、膨大な操作ノウハウ等の情報をサイバー空間の強力なデジタル解析で結びつけ数値化し、定量的に分析するサイバーフィジカルシステム(CPS)と融合する。従来は人でしか対応できなかった高度化・複合化した最先端の機能分析技術を自動化する。

非接触センシングした取得情報に、高次元多変量重回帰モデルの構築やデータ同化、機械学習を適用することで人による「経験と勘」でしかわからなかった操作手法を統合解析する。様々な要因情報の中から最適な特徴量を見つけ、ハンドリング技術の革新を目指す。コア技術となる回転不変マッチング『RIM (Rotational-Invariant Matching)』(特許取得済)を活用し、次世代のスマートハンドリングシステムを創出することを目的とする。

(1) 培地内の細胞はバラバラの状態が存在しており、細胞の選別に人が関与している上、高いコストがかかっているのが現状である。そこで、撮像した画像から自らの位置を判断し、姿勢等を調整する自律機能をもつハンドリング技術を活用した自動認識システムを実現する。

バラバラな状態である細胞群から単一の個体を立体的に自動認識できれば、再生医療の研究等への貢献が大きく期待できる。通常のクローニングは一ヶ月ほど時間がかかるので、実験操作の時間短縮も実現できる。

研究開発の競争が熾烈なバイオ分野では、「人」に代わる画像処理のニーズが強く求められているので、本研究の提案手法で独創的なスマートハンドリングシステムを構築して学術的研究課題を解決する。

本研究では、これまで科研費で研究してきたシーズを連携し、細胞の破損や損傷を避けるためレーザー光を用いて非接触で運動制御してきた。そこで、主に回転不変マッチング等の保有する産業財産権を活用したデジタル技術で、3次元でリアルタイムに細胞をハンドリングできる技術を研究した。

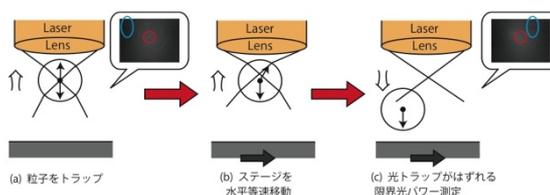


図1 非接触運動制御技術

(2) 従来の方法では、生体細胞に直接レーザー光を照射し光圧によって操作を行うため、細胞の破損や損傷が起こる可能性があった。本研究で提案するハンドリングシステムでは、破損や損傷を起こすことなく細胞の捕捉・輸送ができる。

これまでに、科研費の支援を受けて研究を継続し、様々な粒子や生体細胞の捕捉・移動に成功している。また、独自画像処理技術である回転不変マッチングを利用するため、細胞の3次元移動や回転が可能で、共焦点レーザー操作顕微鏡の焦点位置を変えることなく、スマートハンドリング技術を実現できる。

これまでに科研費で継続してきた研究では、非接触細胞ハンドリングシステムのプロトタイプを完成させた。生体細胞に直接レーザー光を照射せずに、細胞の3次元操作および回転運動ができることを確認している。しかしながら、操作者に依存しないハンドリングを実現するためには、「経験と勘」でしかわからなかった操作を「数値化」し、定量的に分析する必要がある。

この構想が実現できれば、画像処理を用いた細胞の機器分析技術の信頼性が増すので、バイオ分野におけるレーザー光圧を用いた生体細胞の非接触運動制御・機能分析法も確立できる。さらに、細胞内の温度等の機能や仕組みの関係が解明されれば、将来は新たな診断法や医療技術開発、健康食品などの分野にも応用展開できる。

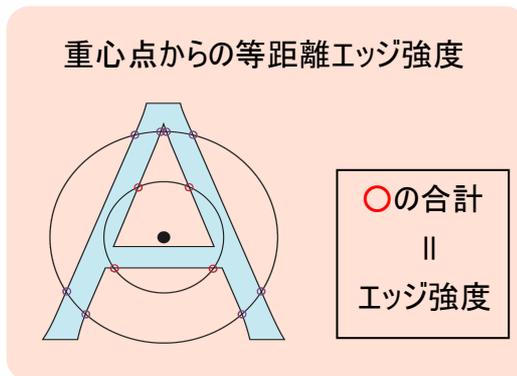


図2 回転不変マッチング (RIM)

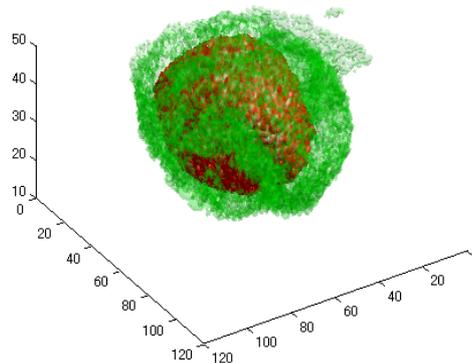


図3 ヒト細胞の画像

3. 研究の方法

2019年度は、(1)サイバーフィジカルシステム (CPS) 環境の構築、(2)非接触機能分析システムの確立を行った。

培地内で細胞の3次元操作や回転運動の最適操作条件を機械学習させ、本研究で提案するシステムと共焦点レーザー操作顕微鏡を組み合わせることによって、細胞の3次元姿勢制御を研究した。断層画像を撮影することによって3次元画像を作成し、「人」に代わり細胞をリアルタイムで計測処理、精緻なハンドリングができるシステムの研究を行った。2020年度は、(3)CPS環境で統合する次世代スマートハンドリングシステムの構築を行い、2021年度は、(4)実用化に向けて、産学官連携で実証実験を実施した。最適操作条件の評価とビジネス・インテリジェンスを考慮したアプリケーションについても研究した。

(1) CPS環境の構築

課題の1つである、細胞の姿勢(回転等)により形状が変化することを防ぐために、図2に示す対象の回転によってパラメータ変動が生じない、重心点からの等距離エッジ強度を利用した。回転量に対して不変なパラメータであるため、回転のための処理を必要とせず高速・高精度で高度情報処理できるCPS環境を構築した。

また、本研究のシステムでは、レーザー光を独立して動かす必要があり、それを実現するために、対物レンズにピエゾステージを導入して動作させる方法を提案した。そして、ピエゾステージからの計測実験データをクラウド上の統計解析システムと繋ぐことによって、CPS環境で細胞の運動制御を行うことを可能とし、より正確にハンドリングが行えるような環境を構築した。6自由度で操作できることで、あらゆる角度から細胞の有用物質の情報を得ることが可能となった。

また、上記のCPS環境に、非接触運動制御技術・非接触有用物質計測技術を連携できるような新しい非接触機能分析システムを研究した。レーザー光を2本使う方法を提案することで、細胞に直接レーザーを照射する必要がなく、細胞の破損や損傷を避け回転運動も可能となる。共焦点レーザー操作顕微鏡の焦点を変えることなく断層画像を取得することが可能となるため、抗体の染色画像を取得してきたときに発生していたカバーガラスの反射の影響を受けることなく、より高速・高精度で細胞の3次元画像を作成できる。細胞を破壊せず有用物質を計測する先進的な手法といえる。

図4に、本研究で構築した次世代スマートハンドリング装置を示す。



図4 スマートハンドリング装置

(2) 非接触機能分析システムの確立

研究の手順を以下に示す。

- ① 2本の15mLコニカルチューブにA4H12細胞株（本来は異種の細胞を準備するが、検討のために同種のを仮使用した）を用意し、一方に赤色蛍光色素、もう一方に緑色蛍光色素液を5 μ Lずつ添加し、懸濁後、37 $^{\circ}$ Cでインキュベーターに2分間静置した。
- ② 各チューブに5mLのERDF培地を加え、混合した後、400Gで5分間遠心、培養上清を取り除いた。
- ③ 細胞ペレットに37 $^{\circ}$ Cに予め保温しておいた50%濃度のポリエチレンコール溶液1mLを1分間かけて添加した。
- ④ ERDF培地を30秒間に1mLずつ、合計9mL添加した。
- ⑤ 400Gで5分間遠心分離し、培養上清を除去したのち、ERDF培地で再懸濁して、スライドグラスに移して顕微鏡画像を撮影した。

(3) CPS環境で統合する次世代スマート

ハンドリングシステムの構築

(1) (2)で研究した複数の非接触技術をCPSで統合することによって、細胞からの反応によるデータを用いて、画像解析イメージングによるスマートハンドリング技術を確立した。引き続き、細胞内の温度によって画像の輝度が変わる方法なども研究し、機能分析と画像処理結果との相関を高次元多変量重回帰モデルのスパース推定で調べ、細胞の反応メカニズムを分析しスマートハンドリング技術を完成する。

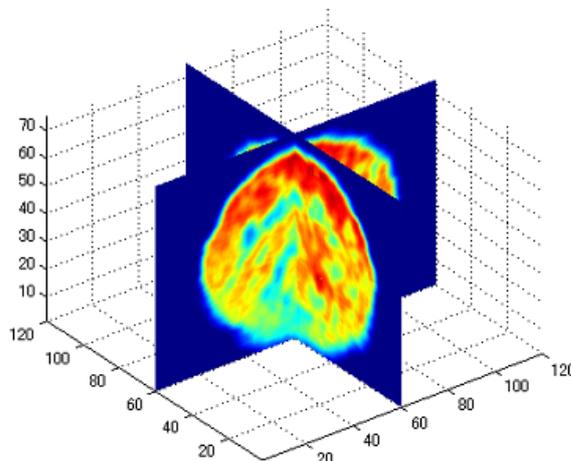


図5 画像解析イメージング例

(4) ロボットテクノロジー・バイオテクノロジー・フォトニクスという3つの分野の融合技術により、マイクロおよびナノレベルの計測、制御を可能とする革新的なハンドリング手法の検証を行った。デジタルツイン技術を活用してシステムの自動化やアプリケーション開発も行った。

4. 研究成果

(1) 各種ガン、網膜浮腫、コロナウイルス増殖抑制など幅広くモノクローナル抗体医薬が利用されてきている。この抗体医薬は、開発初期において、体内で抗体を生産するBリンパ球（白血球の1種、抗体を生産するが体外では寿命がある）と融合パートナー細胞株（体外で無限増殖する細胞）とを細胞融合し、その融合細胞株（ハイブリドーマ：体外で無限増殖し、抗体も生産する）が生産する抗体を医薬化したものである。

細胞融合操作中には、Bリンパ球と融合パートナー細胞株が理想的に融合したもの、他、Bリンパ球同士、融合細胞株同士が融合してしまったものや、融合が生じなかった細胞なども混在しており、こうした混合物からハイブリドーマだけを選別して培養するのは、経験と勘に頼らざるを得なかった。そこで、細胞融合時に、ハイブリドーマを効率よく識別できれば、光ピンセット技術等と組合せ、選別・培養できることにつながり、最終的な必要抗体を効率的に取得可能となる。そして、蛍光色素を利用して、顕微鏡画像から融合細胞株のみを識別した。表1に、本研究で使用した試薬と細胞を記す。

表1 試薬と細胞

使用する細胞	A4H12 ヒト白血球細胞株
使用する試薬	基本合成培地 (ERDF 培地) 融合剤 (ポリエチレングリコール 4,000) 蛍光色素 (緑色：オクタデシルインドカルボシアニン) (赤色：オキサカルボシアニン)

(2) 本実験により、融合していない細胞は緑色、もしくは、赤色の蛍光が観察され、融合した細胞は、その中間色であるオレンジの蛍光を認めた。図6に蛍光染色した細胞による融合細胞の検出結果を示す。左から、緑色蛍光染色細胞画像、赤色蛍光染色細胞画像、融合細胞蛍光画像（オレンジ色が融合細胞株）、明視野画像である。

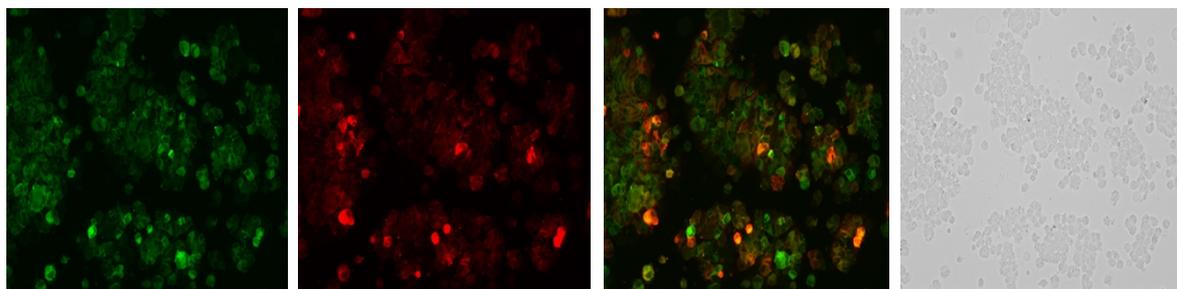


図6 検出結果

(3) 図7は、縦軸が細胞数、横軸が蛍光強度であり、蛍光強度が強いほどDNA含量が多く、一般に細胞融合していない場合のDNA量は、染色体数で2nと4nであるが、融合すると2つの細胞が1つになるので、DNA量は4nと8nになり、4nの位置が重なったグラフとなる。

これらのオレンジの蛍光を発する細胞を一部増殖させて、融合前の細胞とDNA含量を比較した結果、融合細胞株であることを確認した。

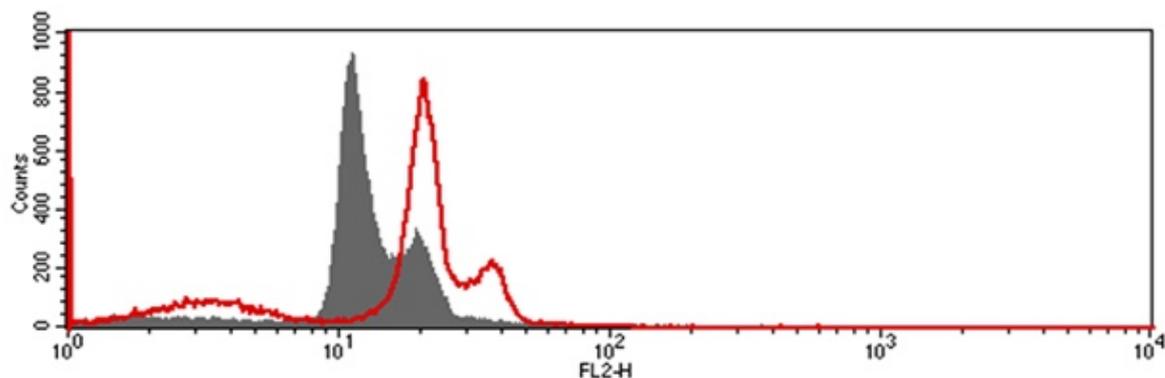


図7 蛍光染色した細胞による融合細胞の検出

(4) 細胞のマーカー分子を蛍光色素で染色することにより、顕微鏡下の視野内で、個別の細胞を検鏡で識別でき、かつ、両方の蛍光を有するものが融合細胞株であることが分かるため、自動識別が可能となる。

したがって、レーザーピンセット等による融合細胞株のみを取得する方法や、逆に融合細胞株のみを残し、その他の細胞にレーザー照射などで熱を加えて除去するなど、融合細胞を効率よく取得できる可能性が示唆された。従来にない高い融合効率を提供できる事例として本方法を応用することが望ましい。

(5) 本研究では、サイバーフィジカルシステム環境の構築と非接触機能分析システムの確立を行うことで、人の経験と勘で行ってきた精緻なハンドリング技術に代わり、細胞をリアルタイムで計測処理・分析ができるシステムの有効性を確認した。今後も暗黙知を形式知化することで、産業界へ大きく貢献できるよう研究を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shigeru KUCHII
2. 発表標題 Industry-Academia Collaborative Initiative of Human Resources Development and the Digitalisation of Manufacturing
3. 学会等名 2019 International Conference on Industrial Technology Innovation (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久池井 茂
2. 発表標題 サイバーフィジカルシステムを活用した自動化と業務革新
3. 学会等名 JSTショートプレゼンテーション
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久池井茂, 宮元章, 祖堅敬
2. 発表標題 研究開発プロジェクトを活用した工学教育と社会実装
3. 学会等名 工学教育研究講演会公園論文集 第67回年次大会プログラム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shigeru KUCHII
2. 発表標題 Digitalisation of Manufacturing
3. 学会等名 Special lecture, FIT-King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	川原 浩治 (Kawahara hiroharu) (20321515)	北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・教授 (57103)	
研究 分担者	吉野 慶一 (Yoshino Keiichi) (40249876)	北九州工業高等専門学校・生産デザイン工学科・特任教授 (57103)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------