

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04310

研究課題名(和文)微小力センサ付きマイクロマニピュレータを用いた細胞成長メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of cell growth using micromanipulator with micro force sensor

研究代表者

洞出 光洋 (Horade, Mitsuhiro)

防衛大学校(総合教育学群、人文社会科学群、応用科学群、電気情報学群及びシステム工学群)・システム工学群・准教授

研究者番号：30583116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：三次元的な微細操作に優れたマイクロマニピュレータの先端に微小力センサを搭載したエンドエフェクタを設置することで、対象物の把持だけでなく反力も計測する取り組みを行った。最終的に20-200 μm スケールの対象物の把持を確認した。さらに、今回は直径150-170 μm の植物根を実際に押し込んで、反力の計測まで実施できた。フォースカーブと呼ばれる押し込み量と反力の相関が取得でき、さらに付着力が影響したと考えられるが、押し込み後の除荷工程時には印可工程と異なる曲線を描いていた。マイクロマニピュレータと微小力センサの組み合わせという新しい取り組みを実施し計測可能であることが確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノマイクロスケールのシステムやロボティクスを用いて細胞操作を行う方法としては、マイクロ流体デバイスが良く用いられている。しかし、接着細胞の評価、立体的な組織など、流体デバイス内で操作が困難なサンプルが扱えなかった。本研究では立体的な組織の操作が容易なマイクロマニピュレータに着目し、さらにセンサを搭載するアプローチで細胞の硬さ等の判断ができることが示唆された。本成果を活かすことで、培養中の細胞硬さを調べたり、立体的な生体組織の評価等、今後新たに対応できる可能性の対象物が増えたと言える。引き続きこの取り組みを続け、今後は培養中の細胞硬さを調べるといった応用に期待がもてる。

研究成果の概要(英文)：By installing an end effector equipped with a microforce sensor at the tip of a micromanipulator that excels in three-dimensional fine operation, not only gripping the object but also reaction force is measured. Finally, we confirmed the gripping of an object on a 20-200 μm scale. Furthermore, this time, a pushing test was carried out on plant roots with a diameter of 150-170 μm , and even the measurement of reaction force could be carried out. We were able to obtain the correlation between the pushing amount and the reaction force, which is called the force curve. Furthermore, although it is thought that the adhesive force had an effect, different curves were drawn between the unloading process after pushing and the loading process. It was confirmed that it is possible to measure by implementing a new approach of combining a micromanipulator and a microforce sensor.

研究分野：ロボティクス

キーワード：マイクロマシン マイクロロボット 微小力センサ 細胞操作 画像解析 MEMS

1. 研究開始当初の背景

細胞や生体組織を評価する手法として、評価する項目に応じて様々な手法が提案されている。本研究では細胞や生体組織の硬さや柔らかさといった、機械的な材料特性の取得に着目した。マクロな対象物の硬さや反力計測においては、ひずみゲージや静電容量型センサを硬さ試験機等に組み込み、直接負荷を与えてその応答を計測する手法が挙げられる。一方で細胞や生体組織といった、対象物が $10\text{-}200\mu\text{m}$ 程度の場合、対象物そのものを顕微鏡下で観察する必要があり、操作そのものが困難であることが挙げられる。近年はナノマイクロシステム的发展により、細胞操作や観察を容易にする手法が提案されてきた。

ナノマイクロシステム技術をベースとした細胞評価において、大きく2つの研究指針を計画した。1つはマイクロ流体デバイスを用いる手法である。利点は複数個の細胞をアセンブリしたりするような操作に適しており、 $10\mu\text{m}$ 以下の対象物でも容易に操作ができることである。デメリットとしては、センサの集積が困難であり、特に反力計測においては画像情報から推定する必要がある。また、操作可能な範囲が平面方向に限定されてしまうということが挙げられる。もう1つの方法はマイクロマニピュレータを用いる手法である。これはクレーンゲーム機のようなロボットアームを小型化したツールであり、最大の利点はマイクロ流体デバイスと異なり三次元的な動きが可能であることが挙げられる。デメリットとしては把持操作にかなり熟練技術が要求されることである。また複数個対象物がある場合には、操作等に時間を要する場合もある。

今回対象物として、接着細胞（赤血球等の浮遊細胞ではない状態）や立体的な組織の硬さを評価したいと考えた。これらは流体デバイス内では操作ができないような形状や状態であり、これらを対象にした研究が特色になると考えた。そこでマイクロマニピュレータを用いて硬さ計測が可能かどうか検討した。こちらはハンドリング等が自在に行えるが、マイクロ流体デバイス同様、センサ等を搭載しなければ反力計測はできない。そこで、マイクロマニピュレータにセンサを搭載できないか検討した。本研究開始に先駆け、センサを搭載したマイクロマニピュレータの試作を実施した。このマイクロマニピュレータで実際に操作だけでなく反力計測が可能かどうか、またこのような取り組み例がないため、どのような課題があるか、あるいはこれまで実現が難しかった対象物の計測が期待できるのか、このような疑問を解決し、新たな計測方法を提案したいと考えた。

2. 研究の目的

マイクロマニピュレータを用いて、微小対象物の操作だけでなくその反力も計測できるようにしたい。そして最終的にはこの手法を用いて接着細胞や立体的な生体組織の一部の硬さを計測するといった、これまでのマイクロ流体デバイスでは実現が困難な計測に挑戦したい。このような目標に対して、従来マイクロマニピュレータ同様の操作を実現し、実際に反力計測、そして硬さの計測方法を提示することが本研究の目的である。

今回使用するセンサ付きマイクロマニピュレータを図1に示す。顕微鏡下に3軸移動が可能なマイクロマニピュレータを設置し、その先のエンドエフェクタに微小力センサを搭載することにした。エンドエフェクタは片持ち梁構造とし、梁上に微小力計測に優れた半導体ひずみゲージを集積した。一般的なエンドエフェクタはガラス管を引張加工したものをを用いるのが主流である。今回は微小力センサとして Si 製半導体ひずみゲージを用いることを前提としたため、MEMS 技術で加工可能な材料や形状に限られる。そのため片持ち梁でなおかつ先端を先細りした形状にすることが、ガラス管製エンドエフェクタの形状に最も近づけられる設計で、なおかつ製作技術の観点からも実現できる形状であった。

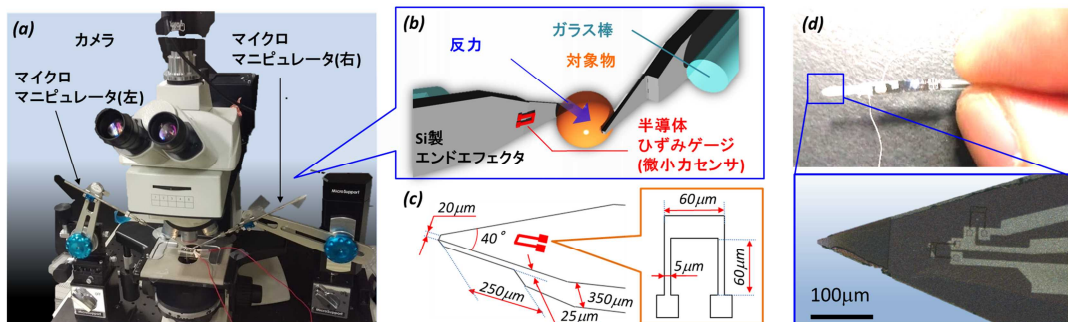


図1 実験システム。(a) マイクロマニピュレータ外観図。(b) 反力計測イメージ図、Si 製片持ち梁に半導体ひずみゲージを集積。(c) デバイスの寸法図 (d) 製作したデバイスの顕微鏡画像。

3. 研究の方法

まず、ひずみゲージそのものを使用するには、市販のンプでは対応できないため、ブリッジ回路等のシステム構築から実施した(図2)。試作した微小力センサを搭載したエンドエフェクタには、あらかじめ直行配置したひずみゲージも集積していた。これは温度補償用であり、特に顕微鏡下で観察することが前提であるため、観察視野内で温度が高く上昇することが予測された。また通常用いるひずみゲージのように、あとから取り付けることは、スケールの問題から困難である。そのため、半導体プロセスで製作する特徴を活かし、あらかじめ温度補償用のひずみゲージを直行配置するようにしておいた。またひずみゲージと繋がるアルミ配線も一カ所既に接続した状態でデザインしておいた。図2左下の顕微鏡画像には、アルミ配線が右側に3本延びた状態となっている。3本のうちの真ん中が計測用ひずみゲージの片側と温度補償用ひずみゲージの片側と接続されている。

得られたひずみと、材料特性(断面係数、弾性係数)設計図(ひずみゲージ配置の距離)から荷重を算出する。試作したひずみゲージの誤差等が影響する可能性はあるが、今回はまず計測可能かどうかというところに焦点を充てている。

また、硬さを定量的に提示することとした。ひずみゲージから反力を推定することは可能である。ただし、硬さそのものを表すことは直接できない。そこで、図3に示すように接触面積と反力から硬さを推定することにした。硬さはマイヤー硬さを用いる。マイヤー硬さは単位面積当たりの反力で示すことが可能である。ただし、接触面積を求める必要がある。そこで顕微鏡画像から接触面積を推定することにした。対象物と接触した顕微鏡画と設計図を照らし合わせて、エンドエフェクタのどの領域が接触しているか確認する。そして先細りしたエンドエフェクタの形状を考慮し、接触領域は台形であると仮定する。接触面積が考慮しやすいように、マイクロマニピュレータも顕微鏡画像が垂直に設置されていることを考慮して配置した。

4. 研究成果

今回は把持が容易でなおかつ、ある程度弾性を有する対象物がよいと考え、直径200 μm 程度の植物の根を用いた。実際に把持自体は可能であることが確認できた。また、その際の画像情報から接触面積の推定も行えることが確認できた。図4に植物根への把持と押し込みを行った際の顕微鏡画像を示す。押し込み試験前は164.5 μm あった植物根を56.3 μm 押し込んだ時の状態である。そして接触領域が108.6 μm であった。顕微鏡画像情報がベースのため、実際には異なる可能性がある。植物根が細長い棒状であると仮定すると、その接

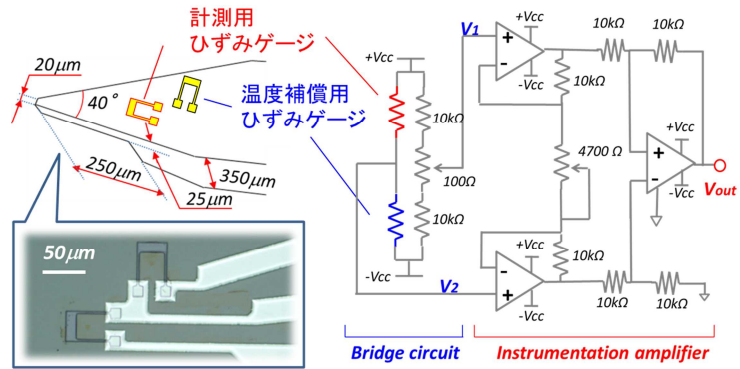


図2 ひずみ計測システム。(左) デバイスイメージ、直行配置したひずみゲージをあらかじめ集積している。(右) 回路のイメージ図、ブリッジ回路と増幅回路を組み込んでいる。

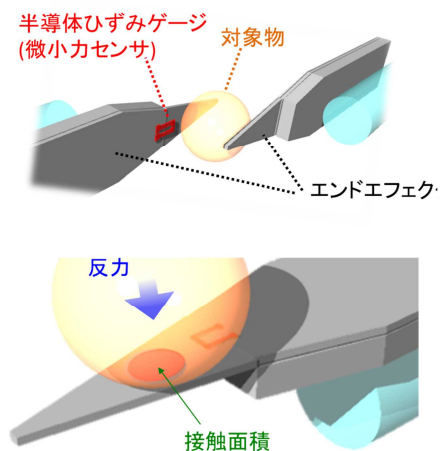


図3 硬さ計測イメージ。反力と接触面積から硬さを推定することにした。

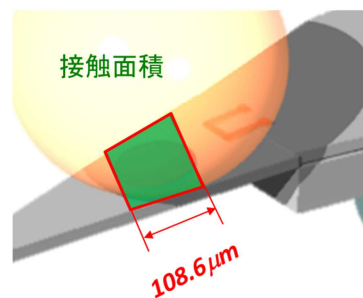
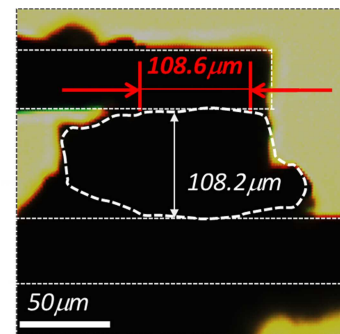


図4 植物根への押し込み試験時の顕微鏡画像。接触領域から接触面積が台形であると面積を推定する。

触面積は台形であると考えられる。あとはエンドエフェクタの設計図を基に、接触面積を算出する。

また反力の計測も行えた。先ほどの $164.5\mu\text{m}$ あった植物根を押し込み続け、 $60\mu\text{m}$ 以上押し込んだ。植物根が弾性に富んだ性質のため、全体の約 $1/3$ 程度押し込むことが可能であった。その際の押し込み量と算出した反力の関係を図 5 に示す。押し込む直前は A の状態である。そこから徐々に押し込み、反力が増加する。最も押し込んだ状態が B である。そこからマイクロマニピュレータをもとの位置に戻して、C の状態まで戻した。しかし負荷印可時（赤線）と除荷時（青線）が一致していない。これは図 5 下側に示すように、対象物との接触力が影響して、片持ち梁自体が変形していると考えられる。これはマイクロスケールの現象として、付着力が重力よりも支配的となるためよく起こることであり、AFM 等の計測でもみられている。

また今回の対象物の場合、 $40\mu\text{m}$ くらい押し込んで、殆ど反力が増加していないことが確認できる。これは対象物が非常に柔らかいためであると考えられる。しかしそのあと $25\mu\text{m}$ （押し込み量 $40\mu\text{m}$ から $65\mu\text{m}$ ）負荷を増やしたところ急激に増加している。根の表面が柔らかく、中心部に向かうにつれて硬くなっている。あるいは押し込まれた根がバネ成分だけでなくダンパ成分のような機械的特性を有していて、ある程度押し込んだ後は復元しようとする力が顕著に表れた可能性もある。

上記のようにこれまでのマイクロ流体デバイスでは計測しにくい対象物で実施できた。また硬さという指標も表すことができた。現段階では新たな計測方法としての提示ができたが、かなり誤差等を含んでいる可能性がたかいため、よりよい計測方法やノイズ低減、さらにこの手法を用いた細胞の形状変形計測等に本格的に挑んでいきたい。

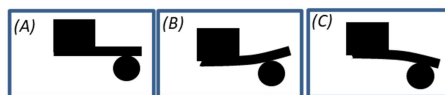
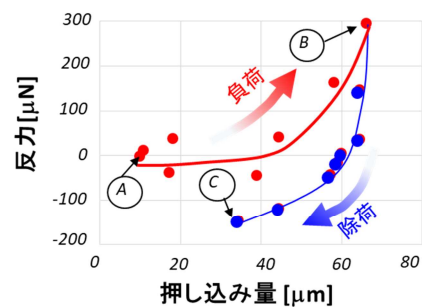


図 5 フォースカーブ曲線. 押し込み量と反力の相関を示す. また A, B, C それぞれの対象物とエンドエフェクタ形状のイメージ図を合わせて掲載する.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horade M	4. 巻 30
2. 論文標題 Establishment of cell patterning method utilising nanopore structure with cell non-adhesive effect	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 035001 ~ 035001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6439/ab650f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 洞出光洋	4. 巻 Vol.19, No.1
2. 論文標題 マイクロ流路チップの三次元化	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学とマイクロ・ナノシステム学会誌	6. 最初と最後の頁 6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horade M, Yamada K, Yamawaki T, Yashima M	4. 巻 31
2. 論文標題 Research on fabrication method for floating structures using general photolithography with high versatility	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 125004, 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6439/ac2d9b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Horade M, Nishimura S, Yamawaki T, Yashima M	4. 巻 31
2. 論文標題 A microchannel device for root hair isolation and behavior analysis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Micromechanics and Microengineering	6. 最初と最後の頁 115003, 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1088/1361-6439/ac2bb0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 洞出光洋
2. 発表標題 ナノスケールポアアレイ構造による細胞の接着防止効果に関する実験的考察
3. 学会等名 第37回「センサ・マイクロマシンと応用シンポジウム」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mitsuhiro Horade
2. 発表標題 HARDNESS MEASUREMENT BY MICROMANIPULATOR WITH EMBEDDED SEMICONDUCTOR STRAIN GAUGE.
3. 学会等名 The 24th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2020). (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 洞出光洋
2. 発表標題 新規細胞パターニング法の開発
3. 学会等名 文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム利用成果発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 洞出光洋
2. 発表標題 髪の毛より細いナノ・マイクロの世界で活躍する機械とロボット
3. 学会等名 令和2年度産学交流セミナー（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 洞出光洋, 田畑修
2. 発表標題 半導体ひずみゲージ搭載型マイクロマニピュレータを用いた細胞変形性能計測
3. 学会等名 第36回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洞出光洋
2. 発表標題 細胞局所刺激・応答計測可能なナノマイクロツール開発への挑戦
3. 学会等名 CUPAL若手研究者による研究発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洞出光洋
2. 発表標題 マイクロファブリケーション技術に基づく細胞特性計測チップの開発
3. 学会等名 第20回医美医大研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 洞出光洋
2. 発表標題 表面ナノスケール凹凸による付着力低減デバイスへの応用
3. 学会等名 2022年度精密工学会春季大会講演
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 洞出光洋
2. 発表標題 微小力計測を目的としたマニピュレータへのひずみゲージ実装に関する研究
3. 学会等名 2022年度精密工学会春季大会講演
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 洞出光洋, 西村空, 佐藤健太, 山脇輔, 八島真人
2. 発表標題 マイクロ流路を用いた植物根の伸長挙動解析
3. 学会等名 第38回「センサ・マイクロマシンと応用シンポジウム」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mitsuhiro Horade, Kei Yamada, Tasuku Yawamaki, Masahiro Yashima
2. 発表標題 RESEARCH ON THE FABRICATION OF HIGHLY TRANSPARENT PLASTIC MICROSTRUCTURES WITH MULTI-STAGE STRUCTURES
3. 学会等名 The 25th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021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

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
---------	---------