

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23505

研究課題名(和文) 振動式力センサを有するマイクロフローセルを用いた高速細胞特性計測

研究課題名(英文) Highspeed cell characterization with respect to the mechanical properties using an oscillatory force sensor

研究代表者

杉浦 広峻 (Sugiura, Hirotaka)

東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・助教

研究者番号：10844805

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、振動式力センサを有するマイクロフローセルを用いたハイスループットな細胞の力学特性計測を実現する。細胞の力学特性は、細胞周期遷移や分化状態などによる内部構造変化を直接定量できる重要な指標である。一方で、従来技術では、細胞群中の個々の細胞をターゲットとした定量的かつ高速な計測が実現できていない。これは、マイクロ流体システムの制御設計やはり構造の静的たわみを用いた力センサの計測原理に起因する。そこで、マイクロフローセルに振動式力センサを実装する技術、ならびに、調和振動子を用いた動的力計測技術を開拓することで、定常流環境下において細胞を連続供給し高速高効率な細胞の力学特性の計測を実現する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般に細胞機能の計測評価は、サンプルの詳細な分析結果を蓄積しながら演繹的に発展させていくボトムアップ的手法と、ニーズをもとに経験的予測に基づく探索を行うトップダウン的手法の双方が取られている。トップダウン的手法は研究開発コストの抑制に効果的である一方で、最速で課題解決の糸口を掴むため、比較実験の際に発生するサンプルの状態の違いをもれなく、正確に十分量取得することが必要である。申請者はこの問題に着眼し、細胞の状態を直接的に示す力学特性を利用し、個々の細胞の状態をハイスループットに計測、評価するシステムが必要であるとの着想を得た。

研究成果の概要(英文)：In this study, we realize high-throughput measurement of cell mechanical properties using a microflow cell with an oscillatory force sensor. The mechanical properties of cells are important indicators that can directly quantify the internal structural changes caused by cell cycle transitions and differentiation states. On the other hand, conventional techniques have not been able to achieve quantitative and fast measurements targeting individual cells in a cell population. This is due to the control design of the microfluidic system and the measurement principle of the force sensor using static deflection of the structure. In this study, we will develop a technique to implement a vibrating force sensor in a micro flow cell and a dynamic force measurement technique using a harmonic oscillator to realize high-speed and high-efficiency measurement of mechanical properties of cells by continuously supplying cells in a steady flow environment.

研究分野：マイクロナノ計測デバイス

キーワード：MEMS microfluidics 細胞の力学特性計測 micro-TAS フローサイトメトリ

1. 研究開始当初の背景

近年、生体機能の解明、医療応用、創薬試験などさまざまな局面で、単一細胞の状態や特性の計測が重要な役割を果たしている。これは、単一細胞が生体を扱う多くの実験、応用の起点であり、その特性が予後の因果律を決定づけるからである。一般に、iPS細胞などの真核細胞は、同一細胞群中であっても無視できない個体差が存在する。そのため、細胞利用を伴う実験や応用では、必然的に個体差の影響が蓄積し顕在化してしまう。近年フローサイトメトリにより無数の細胞の状態を識別可能となったが、抗原抗体反応を用いて既知の情報を選択的に定量化するため、不測の細胞内の状態変化は計測できない問題がある。そこで、標識操作なく細胞状態の変化を直接的に計測、定量化できる力学的な応答特性計測が注目されている。しかしながら、力学特性計測は原子間力顕微鏡(AFM)による方法が主流であり、高速かつ網羅的に個々の細胞の特性を評価することが難しい。そこで本研究では、調和振動子からなる動的力センサを実装したマイクロフローセルにより、フローサイトメトリのように、定常流環境下で高速に細胞の力学特性を計測する技術を開拓する。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(I) 微細加工技術により振動式力センサをマイクロフローセルに実装する方法を開拓し、定常流環境で細胞の力学特性を連続に(200 cell)計測可能とすること、さらに(II) 細胞の力学特性計測技術をAFMに準ずる動的手法に拡張することで、細胞の力学特性をハイスループットに(10 cell/s)計測可能とすることである。

3. 研究の方法

(1) 振動式力センサのマイクロフローセルへの実装

微細加工技術を基盤として、高速駆動(50 kHz)、高感度応答(分解能 100 nN)可能なシリコン製機械式調和振動子を作成し、硼珪酸ガラスによるパッケージングで一体型マイクロフローセルを作成する。また、このフローセルと空気圧流体制御系で、連続 200 cell/s の細胞計測動作を実現する。

(2) 動的力計測技術の開拓、評価

前述の高速駆動、応答可能な振動式力センサを実現するため、位相遅延をともなう全域通過フィルタからなる自励発振回路の作製、顕微鏡に統合化するレーザ変位計(1nm 分解能, 1MHz 応答)の実装、振動子の力学特性の理論解析(特に J, E, Sader らによる粘性散逸の解析を参考に、閉空間の境界値問題を解き、高調波の影響を検討)、動的応答評価(自励発振周波数、力計測感度、ノイズレベルなどの検証)をおこなう。以上の技術を組み合わせることで、振動子に負荷が与えられた際の周波数や振幅特性を利用した周波数変調式力センサを実現する。

4. 研究成果

計測の学理創生と、デバイスを用いた要素技術の実証実験については、当初の予測に則った結果を得た。とりわけ、従来解析の難しかった、細胞の粘弾性計測について、自励振動式力センサの周波数遷移と振幅の減衰量を打ち消すためのフィードバック制御入力を用いてパラメータ同定するといった、具体的な方式を確立した。さらに、レーザを用いた高速変位計測、励振回路の試作を完了させた。これは、位相遅延をともなう全域通過フィルタからなる自励発振回路に加えて、その振幅を RMS-DC 変換器で検出し、PID によるサーボ制御を実装した後にアナログ乗算器を用いて振幅にフィードバックするものである。これによりチップ内の振動式力センサの振幅は常に一定に制御されることとなり、細胞の流路内のつまりが問題となりやすいフローサイトメトリシステム系と適合性の高い、細胞の粘弾性評価技術を実現する事ができた。また、力センサの変位検出は、外部から照射した 1064nm のレーザ光を透過型回折格子と空間フィルタによって1次回折光とし、センサの先端の回折格子で再度マージする。その時の位相遅延によって発生する干渉縞を利用することで、10nm オーダ、100kHz の変位計測を実現する手法を開拓した。

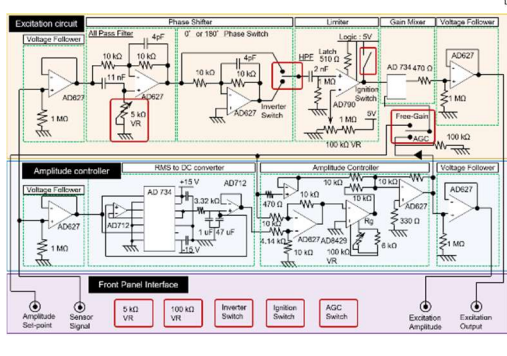


図1 AGCを有する励起外力補償型のFM変調力センサの励振回路

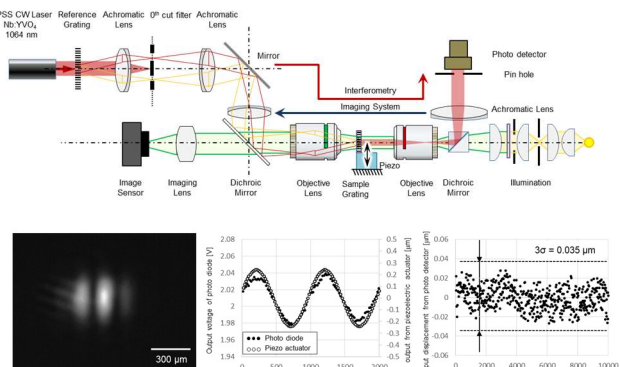


図2 オンチップレーザ変位計の原理実証と性能評価

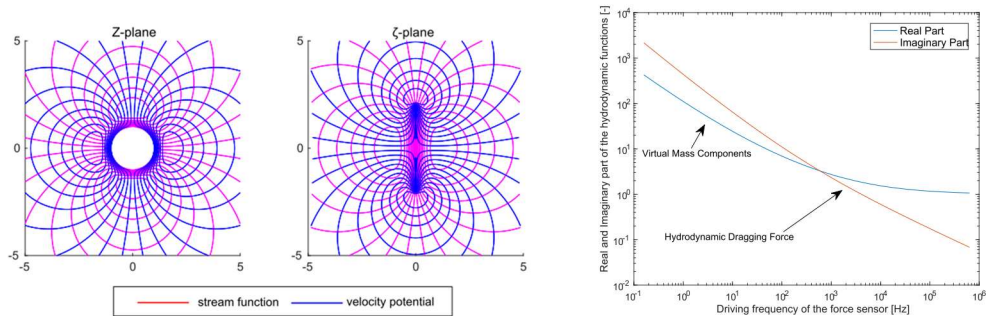


図3 振動する梁構造の周りに発生した流れの複素解析解と、散逸力、付加質量分の評価

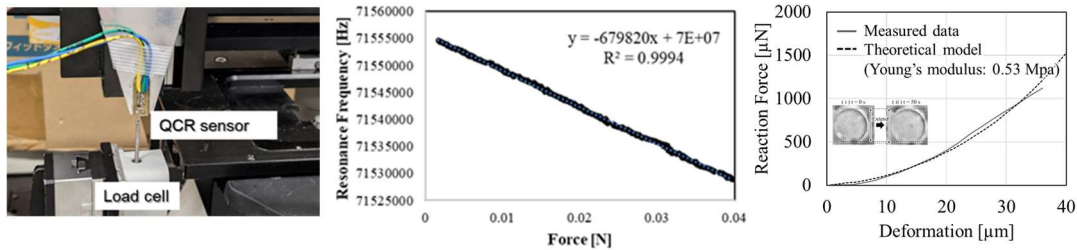


図4 水晶振動子による細胞の硬さ計測、および力計測性能の評価

さらに、機械式振動子固有の問題、カンチレバー周りの流体機械相互作用の影響の見積もりについて、従来計測、評価が難しい部分に関して、ある程度実用的な解析近似を行う方法を開拓した。具体的には、J. Sader らの流体力学関数を用いた、駅中の年生散逸要素に関して、梁構造を折返しとした場合の評価をおこなった。これは、ナビエ・ストークス方程式を摂動的に解くことによって、振動する円形断面梁の周りの流れをもとに圧力から力を換算し、更に複素写像によってその力のスケールリングを行う方法である。これにより、機械振動式力センサの設計指針を解析的に検討することができるようになった。また、従来減少としては確認されていた高調波の励振機構が、この流体力学関数の高次項に起因するものではないかとの見立てを得ることができ、これについては現在応用を検討中である。

この時点において、マイクロフローセルの開発を進め、実証実験を進めようとした矢先に、コロナウィルスの蔓延が発生し、研究拠点の共用研究設備がおよそ4ヶ月程度利用できなくなるという想定外の遅延が発生した。そのため、実験的な評価を一部中止し、より実用的な学理創生に注力するため、センサ部分のさらなる高感度化、及び高速応答性を担保するという目論見で、水晶振動子を用いたセンサ技術の拡充を進めた。これは、従来の機械式振動子よりさらに高い発振周波数で駆動することができるため、高い力計測分解能 (nN オーダ) を実現できるほか、AFM なども含む機械式振動子を用いた力センサと異なり、細胞の押し込み方向と干渉しない厚み滑りモードをキャリアとして利用できるため、AF-FM 変換などの結合の影響を回避できるといったメリットが存在する。水晶振動子によるセンサのプロトタイプは感度向上のためにカンチレバー型とし、フローセル内部に組み込みは、既報の原子拡散接合をベースに実装検討を進めた。今年度では、プロトタイプ的设计が装置状況的に不可能と判断したため、水晶振動子単体を用いた力センサで、ハイスループット評価系を構築し、実際に細胞に見立てた球体の硬さを評価する段階にまではこぎつけることができた。また、従来研究で評価していた細胞の凝集塊の評価を行い、高分子固有のフィラメント構造由来の非線形性を観測できるまでには至った。作製した力センサの感度は0.68 MHz/N程度、ドリフトなども含めた分解能は58nNを記録している。センサの木遣部レーションは、校正済みのひずみゲージセンサを使用した。周波数変調成分は受けた力に対して高い線形性を有し、R2乗値は0.9994であった。

今後は機械振動子を利用した細胞を利用したシステム全体の機能評価を達成することができないため、重点的に検討することが望まれる。また、現状では、フローセル部分の作製コストが高い。定量データを増やし、実験効率を上げるため、さらなるデバイスの小型化や、簡素化などを重点的に検討していく必要がある。また、現在のシステムでは、細胞を一つずつ安定的に供給する技術を達成できていないため、細胞がデバイスに頻繁に固着し、計測を安定的に行うことは、難しい。そこで、デバイスの構造を可能な限りシンプルにし、計測の安定性を確保することが、喫緊の課題である。また水晶振動子にセンサ素子を変更する場合、配線の引き出しや防水処理などに関して、既報の技術をさらに取り込んでいく必要がある。細胞の評価に関しては、近年細胞の組織化などに注目が集まっているため、その組織内部の位置細胞解析としての立場をさらに明確化していくことが重要と考える。また、蛍光プローブに硬さの標識がないことから、たとえば線維化などの機械特性が変わることが確認できる病変モデルなどが適当になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉浦広峻, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 周波数変調式力センサを用いた細胞のオンチップ動的粘弾性計測の検討
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクスメカトロニクス講演会2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉浦広峻, 大崎寿久, 三村久敏, 山田哲也, 竹内昌治
2. 発表標題 誘電泳動力を用いた平面脂質平面膜に対する高速リポソーム導入
3. 学会等名 日本機械学会 ロボティクスメカトロニクス講演会2020
4. 発表年 2020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
---------	---------