

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26630094

研究課題名(和文) 卵細胞の粘弾性の異方性を測る革新的マイクロロボットシステムへの挑戦

研究課題名(英文) Challenge of Innovative Microrobot Systems to Measure Anisotropic Viscoelastic Property of Oocyte

研究代表者

新井 史人(Arai, Fumihito)

名古屋大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90221051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：卵細胞の姿勢を制御し粘弾性を連続的に計測することで、力学的特性の異方性を評価することが可能な革新的マイクロロボットシステムの実現を目的として研究を行った。まず、マイクロ流体チップ上で振動誘起流れを引き起こし、流体力で卵細胞の搬送・位置決め・三次元姿勢制御を行うための基盤技術を開発した。次に、チップに超小型力センサを組み込み、オンチップロボットを用いて卵細胞を変形することで力学的特性が評価できることを示した。本技術を用いてチップ上でマウス卵子の搬送・位置決め・三次元的な回転操作を行った。また、マウス卵子のヤング率を計測し、力学的特性の異方性を調べるための基本原理の有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：We conducted the research on a novel microrobot system, which enables to evaluate an anisotropy of viscoelastic property of embryo cells. Firstly, we developed the technique for transportation, positioning and rotation of embryo cells based on a vibration-induced flow on a microfluidic chip. Secondly, we integrated a miniaturized force sensor and on-chip robot to a microfluidic chip. We confirmed that the viscoelastic property of embryo cells could be evaluated by deforming the cells by the on-chip robot. We succeeded in transportation, positioning and 3D rotation of mouse oocytes on the chip by using the vibration-induced flow. Furthermore, we succeeded in a measurement of Young's modulus of mouse oocytes by using the on-chip robot. Therefore, we succeeded to confirm the feasibility of basic principles of the microrobot system for the evaluation of anisotropy of viscoelastic property of embryo cells.

研究分野：ナノマイクロメカトロニクス, ロボティクス

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 機械力学・制御 細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

近年、不妊症の患者が増えており、体外受精や顕微授精といった不妊治療で生まれる子供は国内で32.4人に1人にのぼる。日本産科婦人科学会のまとめでは、2011年の治療総数に占める妊娠率は20代半ばの女性で20%台後半、これが30代後半では10%台に落ち、出産数の比率は更に低くなる。年齢とともに卵子の細胞質では呼吸やエネルギー生産を担うミトコンドリアの機能やたんぱく質合成の働きが低下し、加齢によって卵子の質が低下することが知られている。晩婚化に伴って、卵子の老化は大きな問題となっている。一方、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、マウスにおいては体外受精して人工妊娠により出産される個体数は約27%に減少することが調べられており、発生率にも卵子の質が関与しているといわれている。このような背景から、受精胚を含む卵細胞の質を評価する研究が今後重要となる。

卵細胞の質を比較する際のパラメータ候補としては形(細胞質)、透明体の光学特性(Pol-Scopeを用いた計測。Zygote, 2006)、硬さ、遺伝子、呼吸活性など様々あるが、中でも卵細胞の硬さは非侵襲的に計測可能であり、形(見た目)に加えて有用な尺度になりうる。実際、受精後の時間経過にとともに、硬さの変化が明確に現れることが知られている(Human Cell, 2006)。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、キャリブレーションや計測に時間がかかる難点があった。また、粘性の計測には向いていない。

そこで我々はマイクロ流体チップにマイクロロボットと超小型力センサを集積化し、これを用いて卵子の粘弾性を連続で自動計測(20秒/個)した(引用文献[1])。計測精度は力センサの設計に依存するが、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、計測速度としては世界最高レベルを実現した。このような高速・高精度を特色とする一方で、卵子の姿勢の影響を評価していないことがこの手法の課題であった。また、不妊治療の分野では、Assisted Hatchingと言って、受精胚が着床しやすくなるように透明体の剛性を局所的に下げる処理を行うことがある。中でも透明体開孔法では透明体に微小な孔を開けているが、孔のサイズは経験的であるため、力学的異方性の知見を得る意義は大きい。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、本研究では卵細胞の姿勢を制御し、粘弾性を連続的に計測することで、力学的特性の異方性を評価することが可能な革新的マイクロロボットシステムを実現することに挑戦する。卵細胞の姿勢(極体の位置や開孔)に応じて、粘弾性の違いを経時的に定量化できるシステムはこれまでになく、計測ニーズは高く画期的な成果が期待できる。この目標に対し、下記4つの研究項目を設けて実施した。

- (1) マイクロ流体チップ中で完全非接触に卵細胞の搬送・位置決め制御を可能とする細胞操作手法を開発する。
- (2) チップ内における局所流れ制御を行い、流体力により卵細胞の姿勢を三次元的に制御する。
- (3) チップ内に超小型力センサを組み込み、オンチップロボットを用いて卵細胞を変形させ、その時間応答をみることで粘弾性を計測する。
- (4) 卵細胞1個に対して異なる姿勢における粘弾性を計測し力学的特性の異方性を調べることで有効性を示し、世界初のオンチップ超精密粘弾性計測の基盤を確立する。

3. 研究の方法

目的で述べた研究項目(1)～(4)を実現するため、下記の方法を用いて研究を実施した。

- (1) マイクロ流体チップ内での卵細胞の搬送・位置決め手法として、マイクロ構造体に振動を印可することにより生じる振動誘起流れを用いた搬送・位置決め技術の開発を行った。
- (2) 上記(1)と同様に振動誘起流れを用い、マイクロ流体チップ中に局所的な渦流れを引き起こすことで卵細胞の回転操作を行った。また、縦回転と横回転を組み合わせることで三次元的な姿勢制御を行った。
- (3) マイクロ流体チップにシリコンの梁構造を利用した超小型力センサを組み込み、オンチップロボットを用いて細胞を変形させるシステムを構築した。このチップにおいて、卵細胞の変形を顕微鏡で観察することでその粘弾性特性の評価を行った。
- (4) 上記(1)(2)(3)の技術を統合し、マウス卵子1個に対して、チップ内での位置と姿勢を同時に制御した。また、超小型力センサとオンチップロボットを同一チップ上に共存させたシステムを構築し、マウス卵子を対象として粘弾性の計測を行い、システムの有効性を確認した。

4. 研究成果

(1) まず、マイクロ流体チップ上で、非接触で卵細胞の搬送・位置決めを行うための基盤技術を開発した。マイクロ流体チップ上にマイクロ構造体を作製し、チップに振動を印可することにより、構造体の周囲に局所的に流れが生じる現象を利用し、卵細胞の搬送・位置決めを行う。本手法では、マイクロピラーを作製し、円振動をチップに印可することにより、ピラー周囲に局所回転流れを誘起する(図1(a))。この現象を利用し、ピラーをアレイ状に並べることで、アレイに沿って卵子の搬送を行うことに成功した(図1(b))。また、印可振動の周波数、振幅を変えることにより、 $2.4 \mu\text{m/s} \sim 35.6 \mu\text{m/s}$ の範囲で搬送速度を変えることができることを確認した。

(2) マイクロ流体チップ上で、非接触で卵細胞の姿勢制御を行うための基盤技術を開発した。(1)と同様に振動誘起流れを利用し、マイクロピラーを三角形に配置したチップに円振動を印可することによって、三角形の中心に局所的な渦流れを引き起こし、卵子の回転を行う。また、横方向(チップ面に対して水平方向)と縦方向(チップ面に対して垂直方向)の振動を印可することによって、卵子の横回転と縦回転を実現することができる(図2(a))。実際にマウス卵子を用いて、横方向、縦方向の振動をチップに印可し、卵子の横回転と縦回転に成功した(図2(b)(c))。また、印可振動の周波数、振幅を変えることにより、横方向は $64.7 \pm 4.0 \text{ degrees/s}$ 、

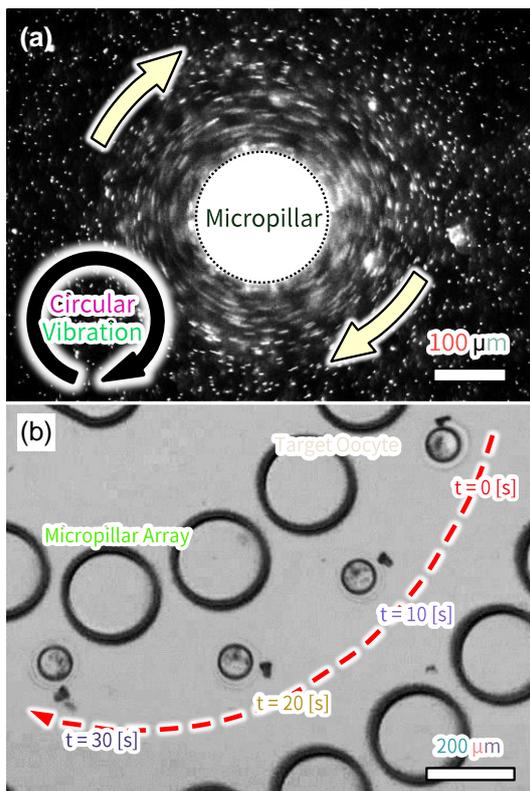


図1 振動誘起流れを用いた搬送技術：
(a) マイクロピラー周囲の振動誘起流れ、
(b) 卵子搬送のデモンストレーション

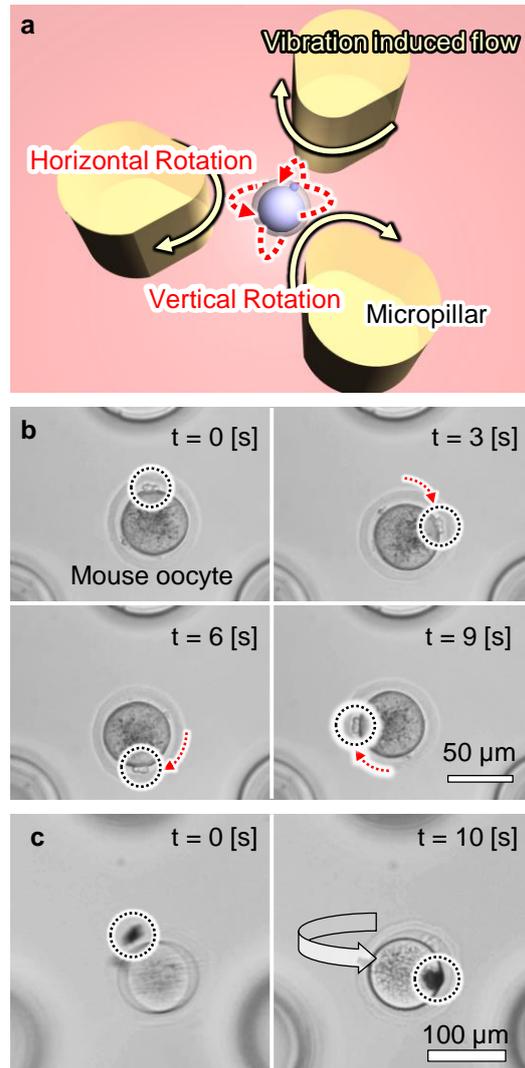


図2 振動誘起流れによる卵子搬送：
(a) コンセプト、(b) 横回転、(c) 縦回転

縦方向は $3.5 \pm 2.1 \text{ degrees/s}$ での回転に成功した。この縦回転と横回転を組み合わせることにより、卵子の三次元的な姿勢制御の可能性を示した。

本手法は、マイクロ流体チップ上にマイクロピラーを作製し、チップに円振動を印可するのみで卵子の姿勢制御を可能とするため、従来の電磁気力を用いて回転させる方法(参考文献[2])と比較して、チップ上への配線が不要であり、より簡便なセットアップで姿勢制御を実現することができる。また、複雑な形状の三次元電極が不要であるため、(3)で作製を行った力センサ、オンチップロボットとの統合も容易である。

(3) 次に、マイクロ流体チップに超小型力センサを組み込み、オンチップロボットを用いて卵細胞を変形、粘弾性を評価するシステムを構築した。卵子計測用のマイクロ流体チップには、シリコンの梁構造を利用した超小型力センサと、卵子を変形させるためのプローブを持つオンチップロボットが搭載されている。計測対象の卵子をマイクロ流体チップ中のプローブ・センサ部まで搬送し、

ローブにより卵子に力を印可して変形させる。力を印可した際に、顕微鏡を用いて卵子の変形量とセンサの変位から反力を計測し、卵子の粘弾性評価を可能とした(図3)。

(4) マウス卵子1個に対して、チップ内での位置と姿勢を制御する実験を行い、原理の有効性を確認した。まず、(1)(2)で開発した卵子の搬送・回転技術を組み合わせ、搬送用ピラーと共に回転用のピラーを配置することにより、チップ上での卵子搬送・位置決め・回転操作を実現した(図4(a))。また、縦回転と横回転を組み合わせ、卵子の核の位置決め操作を行うことに成功し、三次元姿勢制御の原理の有効性を示した(図4(b), (c))。

次に、卵子計測用チップ上でマウス卵子の搬送及び複数卵子の連続計測を行った。5つの卵子に対して計測を行い、ヘルツの接触モデル(図5(a))を適用し、ヤング率を計算したところ、平均値は208.8 Paで、標準偏差は41.2 Paであった。

以上により、卵子の力学的特性の異方性を調べるためのマイクロロボットシステムの実現に必要とされる、卵子搬送技術、三次元姿勢制御技術、超小型力センサ及びオンチップロボットの有効性を示した。今後はこれらの技術を統合したシステムを構築し、高速、高精度に卵子の力学的異方性を計測するこ

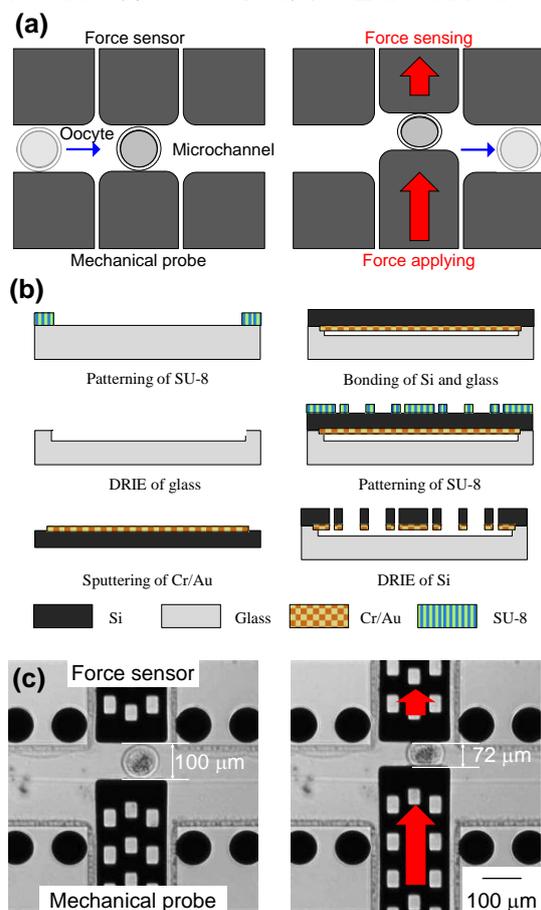


図3 超小型力センサとオンチップロボットを用いた評価システム：(a) コンセプト、(b) 卵子計測用チップの作製プロセス、(c) 卵子変形の顕微鏡観視

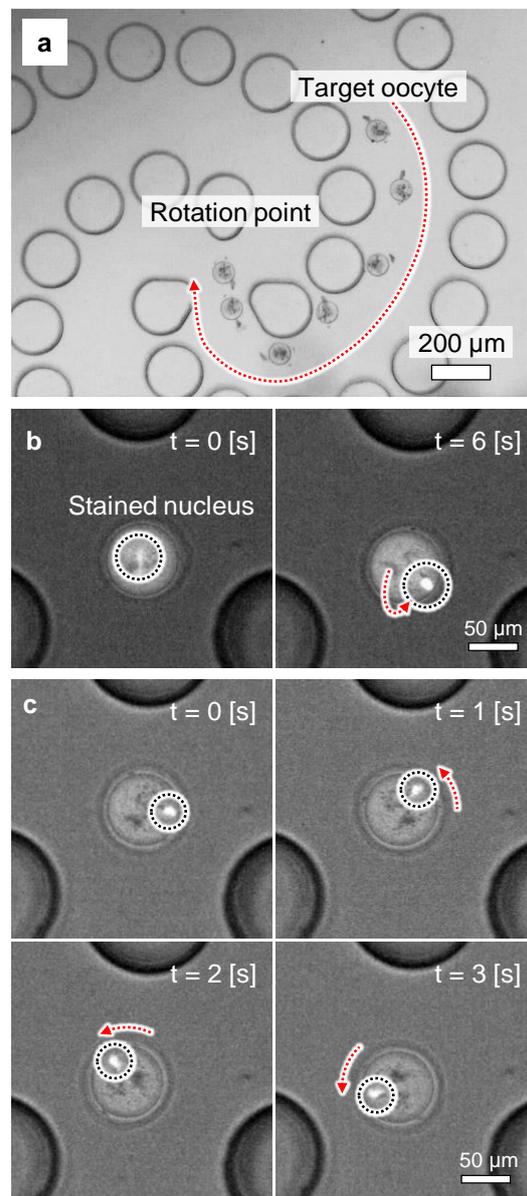


図4 マウス卵子の搬送・位置決め・回転操作：(a) 搬送・位置決め操作、(b) 縦回転及び(c)横回転

とを目指す。このシステムが実現されれば、卵子の質を低侵襲に計測することができ、マウスを用いる生物学研究やウシ、ブタを対象とした畜産業、さらには不妊治療等、様々な分野に貢献することができると期待される。

<引用文献>

[1] Shinya Sakuma and Fumihito Arai, "Cellular Force Measurement Using a Nanometric-Probe-Integrated Microfluidic Chip with a Displacement Reduction Mechanism", Journal of Robotics and Mechatronics, vol. 25, No. 2, pp.277-284, 2013.
 [2] Prateek Benhal, J. Geoffrey Chase, Paul Gaynor, Bjorn Oback and Wenhui Wang, "AC electric field induced dipole-based on-chip 3D cell rotation", Lab on a Chip, vol. 14, pp. 2717-2727, 2014.

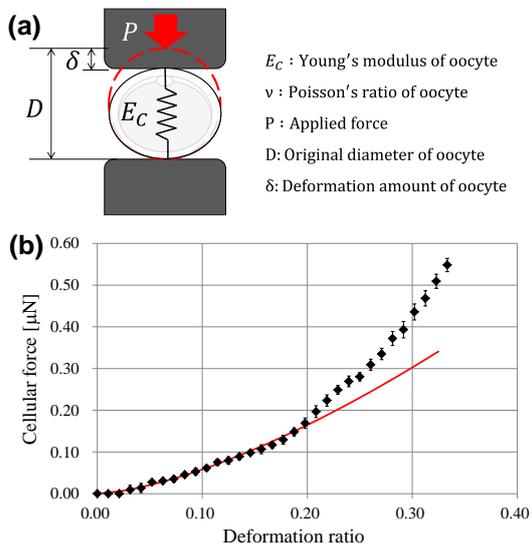


図5 卵子の機械的的特徴量計測:

(a) ヘルツの接触モデル, (b) 変形量と反力の関係

表1 マウス卵子のヤング率計測結果

Oocyte diameter [μm]	E_C [Pa]
80.0	228.7
81.3	239.4
83.8	155.6
81.3	256.5
76.3	163.6

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1件)

- [1] Takeshi Hayakawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, "On-Chip 3D Rotation of Oocyte Based on a Vibration-Induced Local Whirling Flow", *Microsystems & Nanoengineering*, 査読あり, 掲載決定, DOI: 10.1038/micronano.2015.1.

[学会発表] (計 9件)

- [1] 中原康, 伊藤啓太郎, 佐久間臣耶, 新井史人, 「機械特性評価機能を有する卵細胞培養チップ」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 29 回研究会, 東京, 2014年5月.
- [2] 中原康, 伊藤啓太郎, 佐久間臣耶, 新井史人, 「ポテンシャル場を用いた卵細胞の連続フィーディングによるオンチップ機械特性計測」, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2014, 富山, 2014年5月.
- [3] Lin Feng, U Ningga, Fumihito Arai, "Rotation of single bovine oocyte by micro-robot on a chip", 2014 Proceedings of the 6th International Symposium on Microchemistry and Microsystems (ISMM2014), Singapore, Jul. 2014.
- [4] 早川健, 佐久間臣耶, 新井史人, 「振動

誘起流れを用いたオンチップ細胞操作」, 日本ロボット学会第 32 回学術講演会, 福岡, 2014年9月.

- [5] Lin Feng, Bilal Turan, U Ningga, Fumihito Arai, "Three dimensional rotation of bovine oocyte by using magnetically driven on-chip robot", 2014 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS2014), Chicago, Sep. 2014.
- [6] 早川健, 佐久間臣耶, 新井史人, 「振動誘起流れを用いた細胞のオンチップ搬送・回転制御」, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第 30 回研究会, 札幌, 2014年10月.
- [7] Takeshi Hayakawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, "On-chip Cell Manipulation by Vibration-induced Whirling Flow", 2014 IEEE Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2014), Nagoya, Nov. 2014.
- [8] 中原康, 佐久間 臣耶, 新井史人, 「Si-Glass 深堀加工を用いたロボット統合型マイクロ流体チップの作製」, 第15回 計測自動制御学会システムインテグレーション部門講演会, 東京, 2014年12月.
- [9] Takeshi Hayakawa, Shinya Sakuma, Fumihito Arai, "Cell manipulation method based on vibration-induced local flow control in open chip environment", 2015 Int. Conf. on Micro Electro Mechanical System (MEMS2015), Estoril, Jan. 2015.

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0件)
 ○取得状況 (計 0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)
 研究者番号: 90221051
- (2) 研究分担者
 市川 明彦 (ICHIKAWA, Akihiko)
 研究者番号: 20377823
- (3) 連携研究者
 なし