

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26630098

研究課題名(和文) 仮想減速器の着想と高分解能細胞位置決めへの挑戦

研究課題名(英文) New Concept of Virtual Reduction Mechanism and Apply for Cell Positioning with High Precision

研究代表者

金子 真 (KANEKO, MAKOTO)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70224607

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)：マイクロ流路内の細胞位置をコントロールする際、アクチュエータをマイクロ流路内に組み込むミクロ的方法とマイクロ流路外に組み込むマクロ的方法がある。本研究では、アクチュエータのリソースの観点からマクロ的方法に着目した。その際、重要な点はアクチュエータの最小駆動分解能がマイクロ流路内では、面積比が悪くなる点をいかにして克服するか、ここがポイントになる。本研究では、マイクロチップに内在している弾性効果を利用することによって仮想的な減速機構を作り出せることに着目し、最終的に世界最高レベルの250ナノメートルの細胞位置決めを実現した。

研究成果の概要(英文)：The finest manipulation resolution up to 250 nanometer is achieved with a macro-scale actuator in this research project. While the gigantic ratio difference between a macro-scale and a micro-scale fluidic system, a transmission system using PDMS deformation has been developed to make micro manipulation possible on a macro actuator. The research result directly benefits the cost and convenience of micro manipulation, and further, is currently applied on biomedical researches.

研究分野：メカトロニクス

キーワード：マイクロ流路 細胞マニピュレーション 仮想減速器 アクチュエータ 能動的細胞制御 マイクロチップ

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞変形能は細胞の活性度を評価する重要な指標である。例えば、赤血球の場合、変形能を失ってしまうと、極細血管内を通過しづらくなり、結果的に流路抵抗が増加し、局所的な血圧上昇が発生し、最終的に心臓への負担が増加する。そのため、赤血球の変形能評価に対するニーズはきわめて高い。

(2) 細胞変形能評価法には大きく受動的な方法と能動的な方法がある。受動的な方法はマイクロ流路出入口を通過する際の細胞の動きを観察し、変形能評価を行う方法で、能動的な方法はマイクロ流路内で細胞を能動的に動かし、そのときの細胞の挙動を観察することで変形能評価を行う方法である。受動的な方法の場合、原理的には一定圧力差を与えることができるが、実際には、内部流路に介在する弾性効果により、実験条件を一定に維持することがむづかしい。この点、能動的な方法の方が優位ではあるものの、単一細胞をマイクロ流路内において高速・高精度で長時間安定に位置決めする技術は未だ十分確立されていない。

2. 研究の目的

(1) マイクロ流路内の細胞を高速かつ高精度で位置決め可能な細胞マニピュレーションシステムの設計法を確立する。

(2) 実用化した場合の経済性を重視し、細胞マニピュレーションシステムはマイクロチップだけを使い捨てとし、センサとアクチュエータについてはリユースを前提として設計する。

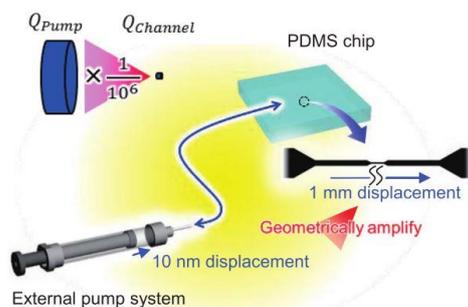


図1 能動的細胞マニピュレーション

3. 研究の方法

(1) センサ、アクチュエータの選択：細胞位置を追跡するためのセンサとしては実時間高速ビジョンをマイクロチップ外に配置する。これにより細胞位置の高速サンプリングが可能になる。一方、アクチュエータの選択肢としてはマイクロチップ内にマイクロアクチュエータを組み込む方法とマクロアクチュエータをチップ外に組み込む方法がある。マイクロアクチュエータをマイクロチップ内に組み込んでしまうと、チップ内で細胞が詰まってしまうと、マイクロアクチュエータ内臓のチッ

プ毎交換する必要が生じ、アクチュエータリユースの観点から望ましくない。そこで本研究では、マクロアクチュエータをマイクロチップの外側に配置する方法を採用する。ただし、この場合には、図1に示されているように、例えば、最小分解能1nmのアクチュエータを用いたとしてもアクチュエータと流路の面積比率により約1億倍の増速機構になるため、単純計算で細胞の動きは1mm程度となり、1μm以下の高分解能細胞位置決めは期待できない。

(2) 仮想減速器の着想：PDMS樹脂製マイクロチップは、マイクロ流路内の圧力が上がると弾性的に変形する性質がある。この弾性変形特性は見かけ上、マイクロ流路内の細胞移動速度を減速する効果を作り出す。したがって、面積比の増速機構があったとしても、仮想減速機構がマイクロチップ内に介在するおかげでマイクロ流路内の細胞を高分解能でマニピュレーションすることができる。

(2) 高速サンプリング：最小分解能1nmでアクチュエータを1ステップ分駆動したとする。その後フィードバック制御をしなければ、時間無限大で細胞はアクチュエータと流路の面積比率分、つまり1mm程度移動して停止する。ところが、短時間で位置フィードバックすると、0~1mmの間で細胞を停止させることができる。したがって高速サンプリングを行うことによって、細胞位置決め分解能はさらに向上することに留意されたい。

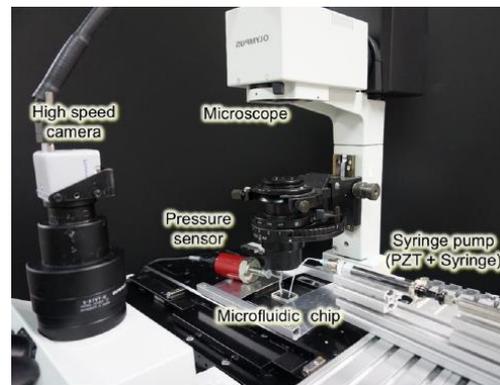


図2 実験装置の概観

(3) 実験装置：図2に実験装置の概観を示す。実験装置は大きく、アクチュエータ、マイクロ流路を内蔵したマイクロチップ、顕微鏡、及び実時間高速ビジョンにより構成されている。アクチュエータの最小分解能は1nm、実時間高速ビジョンのサンプリング周波数は5kHzである。実時間高速ビジョンで細胞位置を検出し、コンピュータを介して、アクチュエータに1ms周期でフィードバックすることにより、細胞の高速・高分解能位置決め制御を目指す。

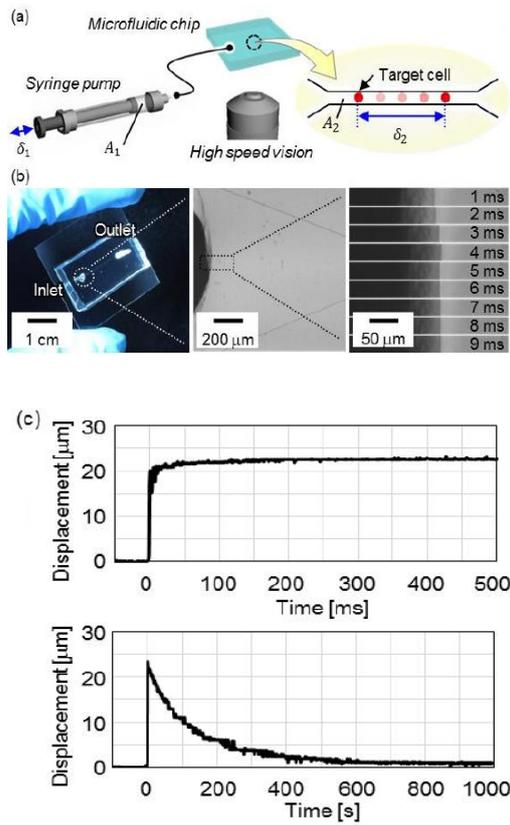


図3 実験装置の構成とチップの弾性特性

4. 研究成果

(1) PDMS 樹脂製マイクロチップの弾性効果の確認：図3(a)のようにマイクロ流路内を密閉した状態でアクチュエータにステップ入力を与え、マイクロ流路内の圧力をステップ状に上げると、図3(b)のようにミリ秒オーダーでマイクロ流路内部の壁面が変形することを視覚的に突き止めた。図3(c)はステップ状に上げた圧力をゼロまで一気に下げた場合、マイクロ流路内部の壁面の変形が時間に対してどの程度の時定数で元の状態に戻るかを示したものである。図3(c)よりほぼ10ミリ秒程度で壁面が10%程度変化していることがわかる。これらの結果はPDMS樹脂製マイクロチップの弾性効果が仮想減速器を作り出していることに対するエビデンスになっている。

(2) 最小分解能特性：マイクロチップの弾性効果がなければ、アクチュエータが最小分解能の1nm移動した瞬間に細胞はマイクロ流路内を1mm移動してしまう。図4は、アクチュエータを最小分解能で動かした場合、細胞は時間的にどのような時間応答をするかを示している。例えば、最小分解能8マイクロメートルの場合、1ミリ秒で約1マイクロメートル程度移動することを意味している。図4の結果から、マイクロチップの弾性効果によって細胞の移動量が大幅に減ること、さらにサンプリング周波数をあげることも細胞位置決め分解能の向上に大きく寄与していることがわかる。

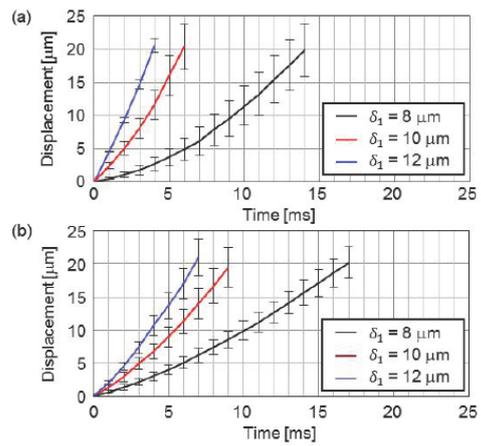


図4 アクチュエータ分解能と細胞変位の関係

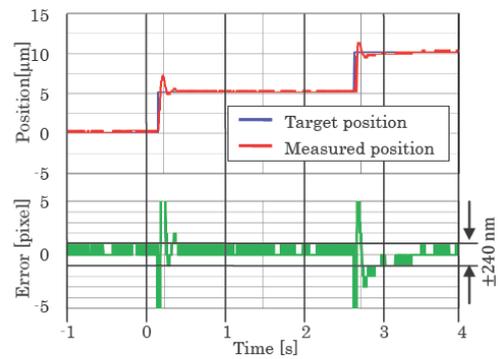


図5 ステップ応答

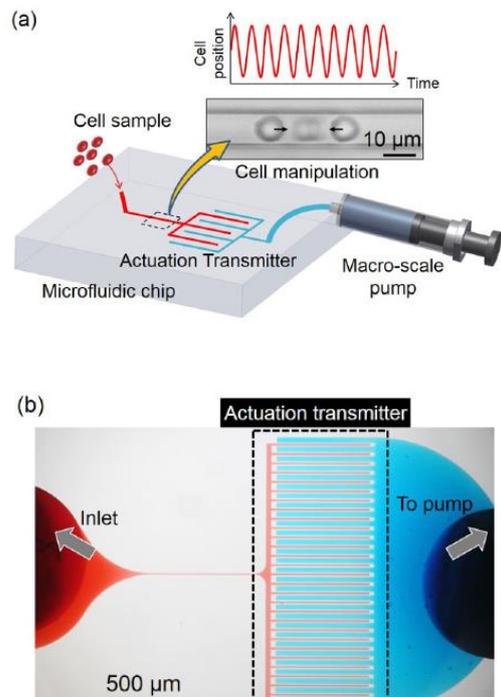


図6 二重構造変換器

(3) ステップ応答特性：図5は目標位置を二段階にわたってステップ状に変化させたときの細胞の応答特性を示したものである。ここで青線、赤線はそれぞれ目標位置、および実際

の細胞位置を表している。図5より、オーバーシュートはあるものの、最終的に平衡状態に落ち着いたときの定常偏差は、240 ミクロンメートル程度で、細胞位置きめ精度としては、世界最高レベルを実現している。さらに応答特性は字定数換算で数ミリ秒オーダーとなっている。

(4) マクロアクチュエータとマイクロ流路の組み合わせの利点：マイクロ流路組み込み型のマイクロアクチュエータと違って、マクロアクチュエータは市場で簡単に入手できるだけでなく、1nm レベルの高分解能、1kHz レベルの高い周波数応答を容易に実現できる。そのため高速化を行う上での十分条件はアクチュエータレベルでは満足されている。しかもマクロアクチュエータには内臓の位置センサの出力を使って安定な位置制御ループが組み込まれている。このようにマクロアクチュエータとマイクロ流路の組み合わせは、アクチュエータとマイクロ流路の面積比に起因する流路内の細胞の増速運動による分解能低下の問題さえクリアできれば、実用化に向け一気に前進することも見えていた。今回の仮想減速器を導入によって、きわめて安定した細胞マニピュレーションシステムが構築できることを実験的に検証することができた点を強調しておきたい。

(5) 二重構造変換器への応用：図6は仮想減速器の考え方を応用した隔壁型圧力変換器である。ここで図6(a)は概念図で、図6(b)は具体的なイメージ図である。例えば赤血球の変形能を調べる場合、テストチャンネル内が血液で満たされるのは当然であるが、アクチュエータ内まで血液で満たしてしまいますと、大量の血液サンプルが必要となり、患者への負担が増す。そのため、図6示すように隔壁を設けることでアクチュエータ内は生理食塩水を用いることができ、テストチャンネルだけ血液を充填すればよくなる。その場合、一番の懸念は周波数応答がどの程度まで維持できるかという点である。周波数応答特性を考察するためのモデリング及び解析については、今後の研究課題」としたい。

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 2 件)

- ① 門澤拓海, 金子真, 蔡佳宏, 佐久間臣耶, 新井史人, On-chip actuation transmitter for enhancing the dynamic response of cell manipulation using a macro-scale pump, *Biomicrofluidics*, 査読有, 9 巻, 2015, 1014114
DOI: 10.1063/1.4907757

- ② 佐久間臣耶, 黒田圭介, 新井史人, 谷口達典, 大谷朋仁, 坂田泰史, 金子真, High Resolution Cell Positioning Based on a Flow Reduction Mechanism for Enhancing Deformability Mapping, *Micromachines*, 査読有, 5 巻, 2014, 1188-1201
DOI: 10.3390/mi5041188

[学会発表] (計 3 件)

- ① 門澤拓海, 佐久間臣耶, 新井史人, 金子真, Red Blood Cell Deformability Checker with Water/Plasma Pressure Transmitter, The 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (Micro TAS2014), Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio USA, 査読有, 2014, 1181-1183
- ② 門澤拓海, 佐久間臣耶, 新井史人, 金子真, Fluid Separated Volumetric Flow Converter (FSVFC) for High Speed and Precise Cell Position Control, IEEE-MEMS, Estoril Centro De Congressos, Estoril Portugal, 査読有, 2015, 1055-1058
- ③ 佐久間臣耶, 黒田圭介, 新井史人, 金子真, 仮想減速器を用いた超精密細胞操作システム, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 富山市, 富山国際会議場, 査読無, 2014, 3A1-A05

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

下記 website にマイクロチップに内臓された仮想減速器の原理を応用した高速細胞マニピュレーションの一例を示す。

<http://www-hh.mech.eng.osaka-u.ac.jp/~mk/Index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子真 (KANeko, MAKOTO)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：70224607

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし