

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：92502

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26820157

研究課題名(和文)多層化粒子観察による細胞力場計測

研究課題名(英文) Measurement system of cell-scaffold interaction force by visually captured beads movement

研究代表者

神山 和人(kamiyama, kazuto)

株式会社竹中工務店 技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：60447331

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1. 二次元平面に配置された細胞の平面内3次元力場計測、2. 細胞外周の3次元力場計測、に関して検証・実験を行った。具体的には、a)多層化2次元平面内粒子移動情報を用いた3次元空間力場の導出方法の考案、b)数十nN程度の微小な力を十分な精度をもって計測可能であるかの確認、c)サブ $\mu\text{m}$ オーダーでの粒子配置方法の考案、d)実計測システム及び性能評価、である。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aim to measure 3 dimensional force field of cell-scaffold interaction force. A method to calculate the force from movements of patterned beads, verification of measurement accuracy, fabrication of two layers of patterned beads and development of a measuring system were accomplished.

研究分野：計測工学

キーワード：力計測 画像処理 計測工学

### 1. 研究開始当初の背景

受精卵などに代表される全能性細胞や多能性細胞は、成長していく形状に応じて成長後の細胞種が決定される。ある形状 A に成長した全能細胞は心筋細胞になり、ある形状 B に成長した全能細胞は肝細胞となる、そのため、どのような環境条件下でどのような形状に細胞が成長していくかを調べることで、環境を制御することで任意の細胞を生成できる可能性を持つ。細胞の形状の変化は、それ自身が発生させる力場によって起こる。細胞が発生する力場を計測することにより、どのような形状に成長するかを調べることが可能である。

微視環境下での力場計測はマクロな環境における計測と大きく異なり、歪ゲージに代表される抵抗変化型センサなどを用いることはできない。そのため、カメラ画像として対象領域を捉え、対象の変化を画像解析によって抽出し、力場計測する手法が主となっている。カンチレバーを計測対象に接触させ、レバーのたわみを画像解析によって得、既知のヤング率等を用いて力を計測する手法が代表的である。これを応用し、マトリクス状にカンチレバーを配置することで、その先端群で形成される平面内の力場計測を行う手法が提案されている[1]。また、PDMS などの弾性体表面上に無数にマーカーを配置し、弾性体表面上で成長する細胞の力場を弾性体の変形を通じたマーカーの移動として捉えることで得る手法も提案されている[2]。これらカンチレバーアレイを用いた手法や、マーカー群を用いた手法は、主として観察用の光学顕微鏡下において細胞を乗せる皿内での 2 次元計測を想定したものである。

一方、細胞成長は 3 次元で起こるものであり、細胞が発生させる力場も 3 次元となることから、培養液中に浮いている状態の細胞をそのまま観察し、3 次元力場を計測しようとする手法も存在する。これは PIV (粒子画像計測) の応用で、観察対象である細胞周辺に細胞より十分小さい粒子を無数に配置し、その移動を計測することで力場を求める。3 次元力場の計測には 3 次元の粒子移動を計測する必要があり、そのため、計測には共焦点レーザー顕微鏡が用いられる[3]。

これら提案手法により力場の計測は可能となっているが、以下の点で更なる改善が必要と考えられる。カンチレバーアレイを用いた手法では、計測面が剣山の先端面のような特殊な環境下となってしまい、環境制御による成長形状の変化を生みにくい。弾性体表面へのマーカー群による手法では、計測が 2 次元となってしまい、体積を持つ細胞の 3 次元力場が計測できない。3 次元粒子移動計測手法では非常に高価な共焦点レーザー顕微鏡が必要になってしまう。

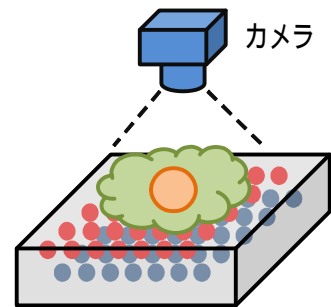
そこで、細胞の 3 次元力場を高精度かつ安価に計測する手法を提案する。この手法は多層化されたマーカー群、または粒子群を多層

構造として捉えることで、その移動を計測し 3 次元力場を求めるものである。

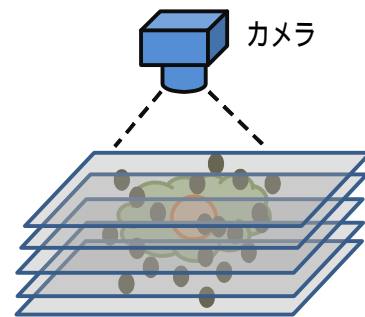
### 2. 研究の目的

本研究では画像解析を用い、粒子群の移動を多層計測することで細胞の発生する力場の計測を行う。力場の計測は 2 次元平面内での計測と 3 次元空間における計測の 2 つの状況を想定する。それぞれに対し、手法の適用性検討・実験による検証を行う。これにより全能性・多能性細胞の分化過程の解析が進捗し、生物分野・医療分野での発展が期待できる。

### 3. 研究の方法



(a) 2次元平面内3次元力場計測



(b) 細胞外周の3次元力場計測

図 1 : 次元力場計測手法

本研究では次の 2 点に関する検証・実験を遂行する。

(1) 2 次元平面に配置された細胞の平面内 3 次元力場計測

(2) 細胞外周の 3 次元力場計測

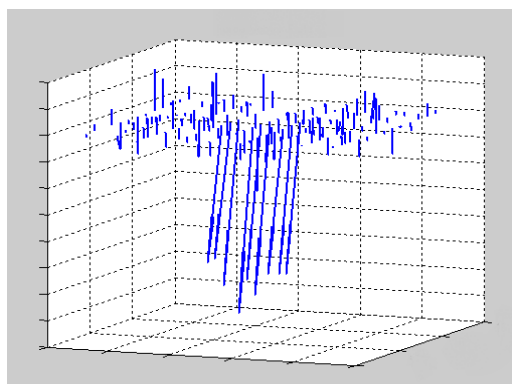
(1)では図 1(a)に示すように透明弾性体に深さを変えたマーカー層を 2 層配置し、細胞成長に伴う弾性体の変形をマーカーの移動として捉え、かつ多層化されたマーカー層より情報量を増やす手法である。微視環境下におけるマーカー位置計測精度の違いや、顕微鏡レンズを用いることによる被写界深度の違いなどによる計測環境の差異を考察し、適用性検討・実機実験を行う。

(2)では顕微鏡のレンズ構成に起因する被

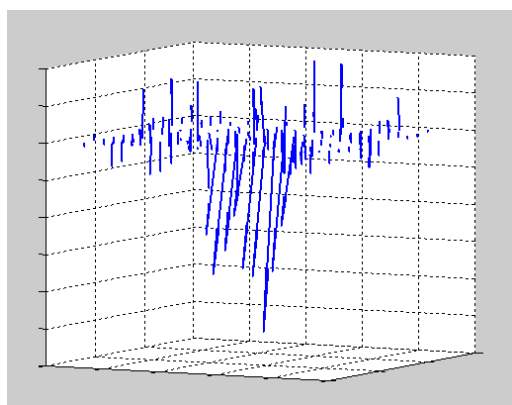
写界深度の浅さを利用し、3次元空間に無数に配置された粒子を断面2次元像として分割する(図1(b))。それぞれ2次元平面層内の粒子移動を捉え、更に層間の粒子移動の差分を利用することで3次元空間中における3次元力場の算出を行う。3次元空間を2次元平面層に分割し計測する手法はPIVにおいてはスリット光による分割手法が存在し、また、被写界深度の浅い光軸系を用い、焦点面をカメラ光軸方向に動かすことで3次元像を生成する手法も存在する。

#### 4. 研究成果

3で示した研究方法を遂行した。具体的には、細胞と足場間に発生する力ベクトル場を計測する装置を提案し、その有効性をシミュレーションによって検証した。さらに、装置をMEMS技術の利用により作成した。シミュレーションでは、マーカーの変位計測精度の比較を行った。その結果、マーカーを規則的に配置(図2(a))することによりランダム配置(図2(b))と比較し、計測精度が向上することが確認できた。また、シミュレーションでは計測時間を検証した。提案した計測手法では共焦点顕微鏡を使用する必要がないため、既存計測手法と比較し計測にかかる時間の大幅な削減が可能である。



(a) 規則的なマーカー配置



(b) ランダムマーカー配置

図2: カベクトル場シミュレーション

最終目標である2層の格子ビーズ層を含む計測デバイスを製作するまでには至っていないが、2層構築の基礎実験や、細胞の力検出の結果(図3)などを踏まえ、今後3次元の力計測が可能で計測デバイスの製作が可能であると考えられる。

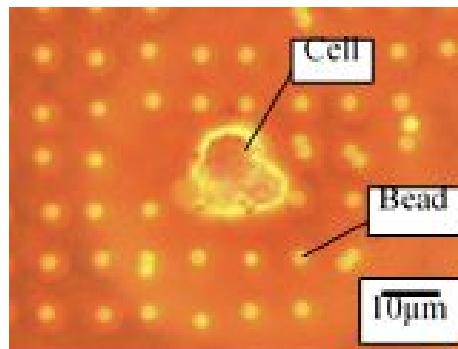


図3: 試作した装置による細胞力場計測

#### 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 0件)

[学会発表](計 3件)

- 1) Yu Hirano, Masaru Kojima, Mitsuhiro Horade, Kazuto Kamiyama, Yasushi Mae and Tatsuo Arai: "Development of High Speed Measurement System for Cell-scaffold Interaction," 26th 2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and HumanScience, 2015.
- 2) 平野佑, 小嶋勝, 洞出光洋, 神山和人, 前泰志, 新井健生: "細胞・足場間相互作用計測用足場の開発", 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, 1J1-5, 2014.
- 3) 平野佑, 小嶋勝, 洞出光洋, 神山和人, 前泰志, 新井健生: "細胞・足場間相互作用計測システムの開発", 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会, 1P1-N07, 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]

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

神山 和人 (KAMIYAMA, kazuto)

株式会社竹中工務店技術研究所・研究主任  
研究者番号：60447331

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし