

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23106003

研究課題名（和文）超高速細胞システム特性計測

研究課題名（英文）Ultra-High Speed Measurement of Cell Properties

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） 92,800,000円

研究成果の概要（和文）：高速アクチュエータと実時間高速ビジョンを用いてマイクロ流体チップ内の細胞を高速かつ正確に操作する方法について研究し、最高130Hzの動特性を実現した。またチップの弾性効果を用いることにより、最高位置決め分解能250ナノメートルを実現した。さらに高速かつ高分解能を実現する方法として、制御系のサンプリング周波数を上げる方法を示した。この高速・高分解能細胞操作システムを用いて、細胞ストレス試験というこれまでにない新しいバイオ試験方法を提案した。ここで細胞ストレス試験とは、マイクロ流路内に狭窄部を導入し、狭窄部入り口間で細胞を往復運動させることにより、細胞の疲労限界を評価するものである。

研究成果の概要（英文）： In order to extract the pure deformability characteristics of cells, it is necessary to improve the resolution of cell actuation in the sensing system. This work discussed how to achieve a high speed cell manipulation with high resolution under a micro fluidic chip. A novel concept in this work is the flow reduction mechanism, where a flow is generated by a macro actuator placed outside of a micro fluidic chip. The flow can be drastically reduced at the cell manipulation point in a micro channel due to the elasticity embedded into the micro fluidic chip. By using this advantage, we could construct a high resolution cell manipulation system and successfully achieved the cell positioning based on a visual feedback control with a resolution of 240nm, together with the maximum frequency of 130Hz.

As an application example, we showed a new concept of cell fatigue evaluation where we continuously impart mechanical stress to the cell until it eventually get a damage.

研究分野：メカトロニクス

キーワード：高速ビジョン 高速アクチュエータ 高速細胞マニピュレーション マイクロ流体チップ 細胞ストレス試験

1. 研究開始当初の背景

細胞変形能と疾患との間に密接な相関がある。例えば万能細胞から2D細胞シート、3D組織、さらには生体組織構築を目指す再生医療では初期の細胞選択の段階で細胞の高速変形能評価が強く望まれている。細胞の変形能評価は一般に細胞群として取り扱われるため、個体差の影響を押さえるため、通常統計的処理が行われる。そのためには少なくとも数百個というオーダーの細胞変形能計測を行う必要がある。そのため速やかに計測を完了する必要がある。高速細胞マニピュレーションに対する強いニーズがあるのはこのような背景による。

細胞を培養液中から出してしまうとたちどころに機能が低下してしまうため、通常は培養液中でのマニピュレーションが前提となる。培養液中でのマニピュレーションに着目した場合、ロボット指を用いる方法、光ピンセットを用いる方法、マイクロ流路内の流れを制御する方法がある。ここでは、ハイスループットが期待できるマイクロ流路内の流れを制御する方法に着目する。マイクロ流路内の細胞マニピュレーションに限定したとしても、大きく二通りの方法がある。一つはマイクロ流路出入り口間で一定差圧を与えた状態で細胞を駆動する受動的な方法で、もう一つはアクチュエータを導入して細胞を操る能動的方法である。図1は能動的方法のシステム構成例で、受動的な手法の場合には単純にアクチュエータを取りはずしたシステムと理解すればよい。図2は受動的な方法で細胞の変形能試験を行っている様子で図3はマイクロ流路の一部に狭窄部を配置し、狭窄部出入り口間で細胞をアクチュエータで往復運動させて、細胞に強制的にストレスを加えて、細胞のストレス限界を計測するシステムのアイデアを示した図である。マイクロ流路を用いた従来の細胞変形能試験のほとんどは、図2のような受動的な方法であり、図3のように制御技術を駆使して細胞に積極的に動きを与えながら細胞変形能試験を行うという方法はほとんど行われていなかった。筆者らはここに大きな学術的新規性を見出した。

2. 研究の目的

高速かつ高精度細胞マニピュレーションを実現するため、細胞の運動自由度を幾何学的に一次元に拘束する。これにより、細胞マニピュレーションが容易になり、処理速度の飛躍的な向上が期待できる。以上の点を踏まえ、本研究では、操作対象の細胞の動きをマイクロ流路によって一次元に拘束する方法を前提とした上で、高速かつ高精度細胞マニピュレーションを実現するためのシステム構成の提案、および処理アルゴリズムの構築を目的としている。高速・高分解能細胞マニピュレーションシステム

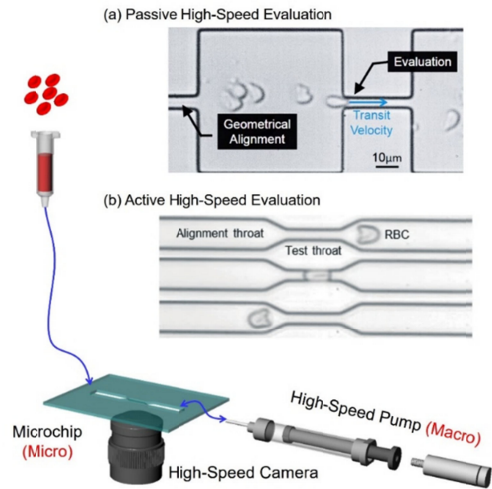


図1. アクチュエータ付き高速細胞特性評価装置の概要

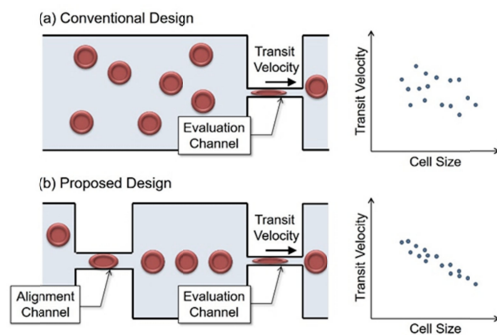


図2. 受動的な方法の例

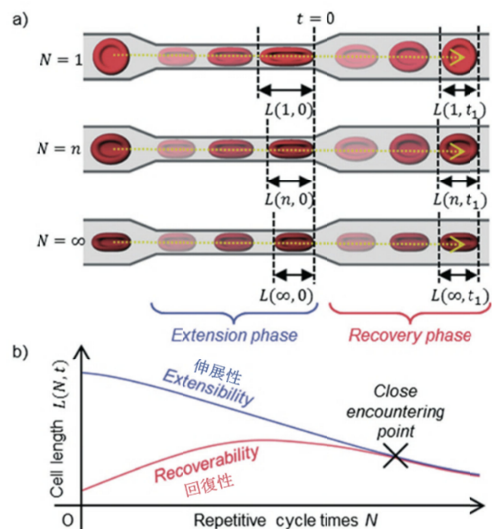


図3. 能動的方法による細胞疲労試験

を構築する上で重要なキーワードが二つ、すなわち高速・高分解能アクチュエータと高速・高分解能センサである。そのいずれか一方が欠けても、高速・高精度細胞マニピュレーションシステムの構築はむづかしいことを付記しておきたい。

### 3. 研究の方法

高速・高分解能アクチュエータについて考えてみよう。マイクロ流路との組み合わせを考えた場合、アクチュエータの選択肢として大きく二通りの方式がある。一つはマイクロ流路内への組み込みを想定したマイクロアクチュエータ方式、もう一つはマイクロ流路外への設置を想定するマクロアクチュエータ方式である。両者とも一長一短ある。マイクロアクチュエータ方式は、マイクロ流路に組み込むため、アクチュエータの分解能がそのまま細胞の位置決め分解能に対応する。そのため細胞の位置決め分解能という切り口で考えると、高分解能を維持しやすい。これに対し、マクロアクチュエータを用いると、アクチュエータ断面積とマイクロ流路断面積比  $A_1/A_2$  分細胞の位置決め分解能は低下する。ここで  $A_1$ 、 $A_2$  はそれぞれアクチュエータ側の断面積およびマイクロ流路側の断面積である。このようにマクロアクチュエータ方式には分解能という切り口ではハンディキャップを背負っているにも関わらず、筆者らは、マクロアクチュエータ方式を採用した。その一番の理由は、経済性、すなわちアクチュエータのリユース機能を重視したかったからである。例えば、細胞がマイクロ流路内で詰まってしまった場合、アクチュエータをチップ内に組み込むマイクロアクチュエータ方式の場合、アクチュエータも同時に不良品になってしまう。しかもアクチュエータを組み込んだチップの製作には多大な時間と費用がかかってしまう。これに対して、マクロアクチュエータ方式の場合、マイクロ流路内に細胞が詰まった場合、アクチュエータと切り離して、マイクロチップのみを不良品として新品にとりかえればよい。このため製作時間、コストを考えると圧倒的に経済的になる。しかもマクロアクチュエータはマイクロアクチュエータと違って、市場で入手しやすいだけでなく信頼性も高い。つまり、位置決め分解能さえクリアできれば、マクロアクチュエータとマイクロ流路の組み合わせの方が圧倒的にメリット大である。ただし断面積比  $A_1/A_2$  は通常  $10^6$  のオーダーとなり、マクロアクチュエータの分解能が  $1\text{mm}$  としても、マイクロ流路内の細胞の位置決め分解能は  $1\text{mm}$  オーダとなり、位置決め精度を向上させる上での大きな障害になる。ところが PDMS (ある種のプラスチック) 製マイクロ流路は、内圧変動によってチップ内体積が変動する弾性特性を有しているにもかかわらず、応答性は kHz オーダときわめて高い。つまりマイクロ流路内に細胞の動きを遅くする“仮想減速器”が存在していると考えられる。筆者らは、この点に着目し、マクロアクチュエータとマイクロ流路の組み合わせであるにも関わらず、細胞の高分解位置決めを目指す。

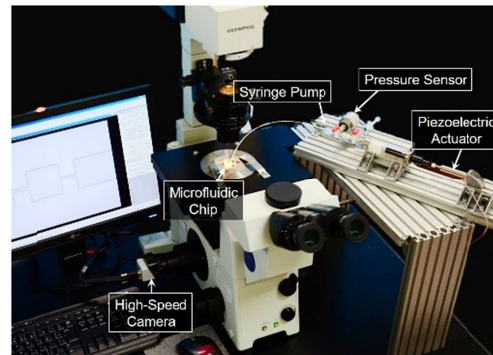


図 4. 実験システム

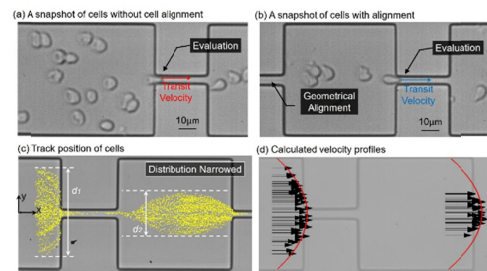


図 5. 基礎実験 (受動的な方法)

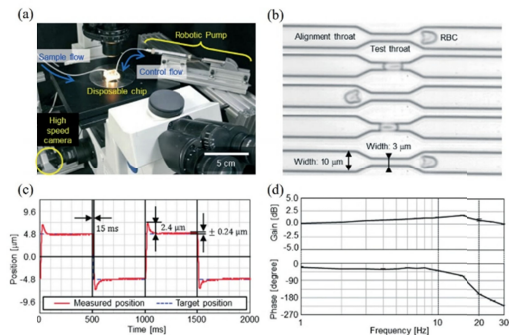


図 6. 基礎実験 (能動的な手法)

次に高速センサに目を向けてみよう。高速センサとして使用できる候補として、電気インピーダンスセンサ、高速ビジョンセンサ等が考えられるが、ここでは高速ビジョン方式を採用した。高速ビジョンを採用した一番の理由は必要に応じて細胞の動きがモニターできることを利用したかったからである。つまりマイクロ流路内で細胞がどのような振る舞いをしているのかデータログとして残せる利点に魅かれた。

図 4 は実験装置の概観である。細胞の位置は倒立型位相差顕微鏡 (OLYMPUS : IX71) を通して高速ビジョン (Photron : FASTCAMMH4-10K) を用いて  $3000$  [frames/s] で撮影し、高速画像処理ボード (i-i-lab.) を用いてリアルタイムに画像処理し、制御用 PC に送られる。画像の空間分解能は  $0.24$  [ $\mu\text{m}/\text{pixel}$ ]。図 5 はマイクロ流路出入口間に一定の圧力差を与えた状態で、赤血球がマイクロ流路内を通過する時間から赤血球の変形能を評価する実験を

行っている様子である．また図6は能動的  
手法により細胞ストレス試験を行っている  
様子である．

#### 4. 研究成果

図7は一定圧力差を与えた状態で，赤血  
球のマイクロ流路内での動きを連続写真と  
して捕えた一例である．この場合，一定圧  
力差を維持しておけば，赤血球を操る特別  
なアクチュエータは不要である．筆者らは  
オンライン高速ビジョンで400個/secの赤  
血球の硬さ評価を行うことに成功した．つ  
まりわずか数秒で4桁の赤血球の硬さ評価  
が行える勘定になり，臨床応用が一気に現  
実味を帯びてくる．

極細流路の中に幅3ミクロンメートルの  
狭窄部を設け，一回通過する際のストレス  
レベルをあげてみた．基本的には極細流路  
内での赤血球の伸展能と極細流路からでた  
後の回復能を同時計測し，さらにストレス  
試験の回数によって両指標がどのように変  
化していくのかストレス回数毎に追跡する  
という方法である．重要な点は，ストレス  
回数毎に赤血球の伸長特性も回復特性も悪  
くなり，結果的に両者が一致する疲労限界  
回数  $N$  が必ず存在し，その回数をその赤血  
球の変形能限界と見なす．図8は6種類の  
赤血球に対して，疲労限界回数を実験的に  
評価した結果を示したグラフである．ここ  
で横軸はストレス回数を示し，縦軸は狭窄  
部内の細胞長さ（青）及び狭窄部から出た  
直後の細胞長さ（赤）を示している．これ  
まで伸展能と回復能はそれぞれ個別に実験  
が行われていたが，それらを同時に調べる  
ことによって，個体差や実験時間からくる  
ブラックボックスを排除しようとしている．  
図8はストレス試験中の赤血球の様子を  
示したものである．図9a)は疲労限界回  
数  $N$  と赤血球の大きさとの相関をとったグ  
ラフである．図9b)は，縦軸に変形能限界，  
横軸に一回目のストレス試験における伸長  
特性と回復特性の差を無次元化したパラメ  
ータ  $EI$  で整理している．図9b)からも両者  
の間で相関があり，一回目に大きな差がで  
る赤血球は変形能が高く，疲労限界回数  $N$   
も大きくなっていることがわかる．このこ  
とは，ストレス回数を増やさなくても，一  
回の細胞伸長特性を測るだけで，細胞の疲  
勞特性を見積もることができることを意味  
している．

なお，マイクロ流体チップを使った細胞  
マニピュレーションに対して，以下の知見  
を得た．

高速化：マイクロ流体チップを硬くする．  
高分解能化：マイクロ流体チップを柔らか  
くする．

高速かつ高分解能化：マイクロ流体チップを  
適度に硬くし，かつ制御系ループのサンプ  
リング周波数を上げる．

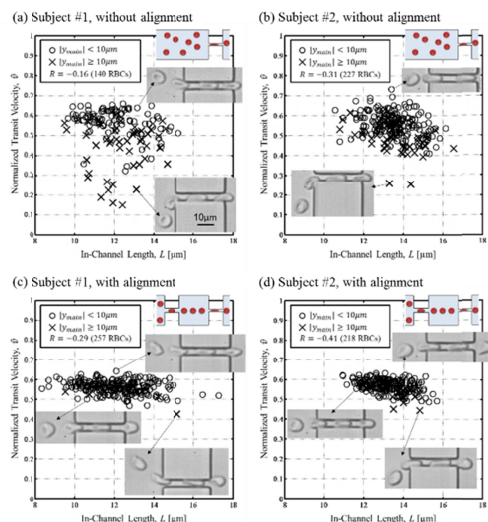


図7. 細胞通過速度と細胞長との関係

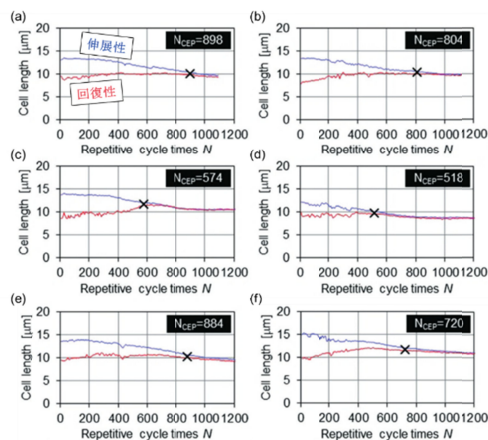


図8. 伸展性と回復性が交わる CEP の例

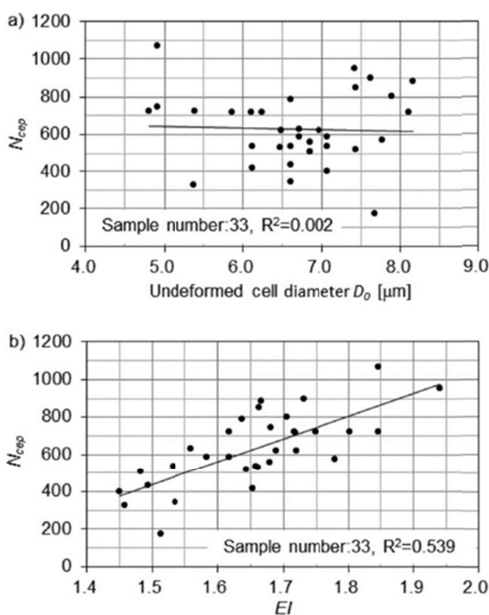


図9. CEP と細胞サイズ及び初回伸展性

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 21 件)

田中 信行, 東森 充, 金子 真, 対象物変形に伴う流体力変動を考慮した非接触剛性センシング, 計測自動制御学会論文集, 査読有, 48 巻, 2012, 295 - 301

DOI: 10.9746/sicetr.48.295

福井航, 金子 真, 川原知洋, 山西陽子, 新井史人, 幾何学的運動拘束を利用した拘束・高精度細胞マニピュレーション, 日本ロボット学会誌, 査読有, 30 巻, 2012, 655 - 661

DOI: 10.7210/jrsj.30.655

K. Tadakuma, N. Tanaka, Y. Haraguchi, M. Higashimori, M. Kaneko, T. Shimizu, M. Yamato and T. Okano, A Device for the Rapid Transfer/Transplantation of Living Cell Sheets with the Absence of Cell Damage, Biomaterials, 査読有, 34 巻, 2013, 9018-9025

DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.08.006

N. Tanaka, M. Kondo, R. Uchida, M. Kaneko, H. Sugiyama, M. Yamato and T. Okano, Splitting Culture Medium by Air-Jet and Rewetting for the Assessment of the Wettability of Cultured Epithelial Cell Surfaces, Biomaterials, 査読有, 34 巻, 2013, 9082-9088

DOI:

10.1016/j.biomaterials.2013.08.029

S. Sakuma, K. Kuroda, C. Tsai, W. Fukui, F. Arai and M. Kaneko, Red Blood Cell Fatigue Evaluation Based on the Close-encountering Point between Extensibility and Recoverability, Lab Chip, 査読有, 14 巻, 2014, 1135-1141

DOI: 10.1039/c3lc51003d

C. Tsai, S. Sakuma, F. Arai and M. Kaneko, A New Dimensionless Index for Evaluating Cell Stiffness-based Deformability in Microchannel, IEEE Trans. on Biomedical Engineering, 査読有, 61 巻, 2014, 1187 - 1195

DOI: 10.1109/TBME.2013.2296624

R. Murakami, C. Tsai, M. Kaneko, S. Sakuma, and F. Arai, Cell Pinball: Phenomenon and mechanism of inertia-like cell motion in a microfluidic channel, Lab Chip, 査読有, 15 巻, 2015, 3307 - 3313

DOI: 10.1039/C5LC00535C

T. Monzawa, M. Kaneko, C. Tsai, S. Sakuma and F. Arai, On-chip actuation transmitter for enhancing the dynamic response of cell manipulation using a macro-scale pump, Biomicrofluidics, 査読有, 9 巻, 2015, 014114

DOI: 10.1063/1.4907757

### 〔学会発表〕(計 26 件)

C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, Enhanced Cell Stiffness Evaluation by Two-Phase Decomposition, MicroTAS, Okinawa, Japan, 2012, 査読有, pp1009-1011.

C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, Evaluation of Cell Impedance Using a  $\mu$ -channel, IEEE EMBC, San Diego, USA, 2012, 査読有, pp 5518-5521.

C. Tsai, M. Kaneko, S. Sakuma and F. Arai, Distinct Patterns of Cell Motion inside a Micro-Channel under Different Osmotic Conditions, EMBC, Osaka, Japan, 2013, 査読有, pp5525-5528.

C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, Image-Based Screening for Erythrocyte Characteristics of Patients Receiving Dialysis Service, ASN Kidney Week, Atlanta, USA, 2013, 査読有, 128A.

T. Monzawa, S. Sakuma, F. Arai and M. Kaneko, Red blood cell deformability checker with water/plasma pressure transmitter, MicroTAS, San Antonio, USA, 2014, 査読有, pp1181-1183.

C. Tsai, M. Kaneko and F. Arai, What is the Difference of Cell Deformation between PUSH and PULL?, MicroTAS, San Antonio, USA, 2014, 査読有, pp793-795.

T. Monzawa, S. Sakuma, F. Arai and M. Kaneko, Fluid separated volumetric flow converter (FSVFC) for high speed and precise cell position control, IEEE MEMS, Estoril, Portugal, 2015, 査読有, pp1055-1058.

R. Murakami, M. Kaneko, S. Sakuma, and F. Arai, "Cell pinball": what is the physics?, IEEE MEMS, Estoril, Portugal, 2015, 査読有, pp431-434.

C. Tsai and M. Kaneko, On-Chip Pressure Sensing by Visualizing PDMS Deformation using Microbeads, IEEE MEMS, Estoril, Portugal, 2015, 査読有, pp722-725.

### 〔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-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

東森 充 (HIGASHIMORI, Mitsuru)  
大阪大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号：30346522

(3) 研究分担者

多田隈 建二郎 (TADAKUMA, Kenjiro)  
大阪大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号：30508833