

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901
 研究種目：若手研究(A)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17H04913
 研究課題名(和文)スフェロイドの機械特性ソーティングを基軸とした培養環境との機械的相互作用評価

研究課題名(英文)Evaluation of mechanical interaction between cell spheroid and culture environment based on mechano-index activated sorting

研究代表者
 佐久間 臣耶(Sakuma, Shinya)
 名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：40724464
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、高剛性のロボット統合型マイクロ流体チップを用いて、チップ内の力計測プローブを用いて、スフェロイドを変形し、その時の画像情報と力情報から、スフェロイドの機械的特性し、計測した機械的特性の情報に基づき分取操作を行う、機械指標活性型スフェロイドソーティングシステムを構築した。26個のMSCスフェロイドを用いた実験により、3.14個/分のスループットでの、連続した機械特性計測、および、MSCスフェロイドとマイクロビーズの混合溶液を用いたソーティングの基礎評価を行い、MSC: 5個/5個、ビーズ: 5個/5個の、連続した機械指標活性型オンチップソーティングを達成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オンチップソーティング技術は、細胞集団の中から特定の指標に基づきある細胞集団を分取する技術であり、単一の細胞・スフェロイド・オルガノイド解析において重要な技術として広く用いられている。現在は、蛍光活性型細胞ソーティング(FACS)に代表されるように、分取指標として蛍光指標が主流であるが、さらなる詳細な単一細胞の解析、および、従来では見つけることができなかったユニークな細胞の発見・分取のためには、新たな計測モダリティが必要であると考えられる。本研究で構築した機械指標活性型ソーティングは、従来のソーティングモダリティに機械指標という新たなモダリティを付与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrated a mechano-index activated sorting of cell spheroids based on a robot-integrated microfluidic chip. The chip contains a pair of force sensor probes, where force sensing is based on measuring the deformation of beams of the probes. By utilizing the constructed system, we obtained Young's modulus of spheroids from the data of deformation and force which was measured by the images taken through a CCD camera. We performed the experiment of continuous mechanical indexing of cell spheroid using 26 MSC spheroids, and the results showed that the measurement throughput of 3.14 spheroids per minutes. Finally, we demonstrated the on-chip sorting based on the mechanical index of Young's modulus using a mixed solution of MSC spheroids and microbeads, and succeeded in the continuous machine index activated on-chip sorting of MSC: 5/5 and beads: 5/5.

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

キーワード：機械的特性計測 スフェロイド ソーティング MEMS microTAS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の再生医学においては、単一細胞を大規模に組み上げて臓器にする方法に代わり、単一細胞を小規模に組み上げてスフェロイドとし、多数のスフェロイドを器官原基として移植することで臓器へと誘導する方法に注目が集まっている。現在までに、スフェロイドの分化を誘導するためには、スフェロイドと培養環境の機械的な相互作用が重要な役割を果たすことがわかってきた。これらの研究結果から、スフェロイドの分化には、培養時の基材の硬さ(外環境)のみが重要な機械的な作用をするのではなく、スフェロイドそのものの硬さ(内環境)も重要な機械的な作用をおよぼすのではないかと考えられる。

スフェロイドの硬さ計測の例として、マイクロピペット吸引法を用いた方式が挙げられる(K. Guevorkian, et al., Phys. Rev. Lett., 2010)。この方式では、スフェロイドの大きさより小さな内径を有するマイクロピペットを用いて吸引し、その時の吸引圧力と変形形状から硬さを算出する。マイクロピペットを取り付けた機械式マイクロマニピュレータを用いることで多自由度操作が可能一方で、基材とスフェロイドのそれぞれ硬さの分化誘導に対する影響の統合的な調査を行うためには、一つのスフェロイドの計測に100分以上の時間がかかるためスループットが低いという問題がある。このように、単一のスフェロイドの硬さをハイスループットに計測する難しさに大きく起因し、スフェロイド培養時における、基材とスフェロイドのそれぞれ硬さ分化誘導に対する影響の知見は乏しい現状から、スループット向上への期待が高まっている。

従来我々は、ハイスループット計測が可能な手法として、マイクロ流体チップ内にオンチップロボットを統合した、ロボット統合型マイクロ流体チップを用いた機械特性計測を提案してきた。マイクロ流体チップ内の搬送流路中で、内部に組み込んだプローブと力センサによって対象の細胞の粘弾性特性を連続的に計測することに成功している(JRM, 2013, Micromachines, 2015)。現在までに、マイクロ流体チップの搬送流路系を用いることで、連続した細胞の機械特性計測に成功しているものの、スフェロイドの機械特性をハイスループットに計測するためには、直径が数百マイクロメートル程度の大きな微粒子を操作するための、オンチップロボットの設計およびその駆動方法の決定、流体制御システムの設計論の構築、さらにはソーティング技術との融合等の課題が存在した。

2. 研究の目的

本研究では、スフェロイドの機械特性をハイスループットに計測するために、従来我々が提案したロボット統合型マイクロ流体チップを用いた機械特性計測手法を深化・発展させ、さらに、オンチップ細胞分取技術を統合することで、スフェロイドを硬さに応じて分取し、スフェロイド培養時における、基材とスフェロイドのそれぞれ硬さの分化誘導に対する影響評価に貢献する新たな細胞分取技術の創出を目指す。そのために本研究では、図1に示すような、ロボット統合型マイクロ流体チップを用いて、高速にスフェロイドの硬さ等の機械的特性を計測し、計測した機械的特性の情報に基づきスフェロイドをマルチにソーティングするための、機械指標活性型スフェロイドソーティングシステムの構築を目的とする。具体的には、計測対象となるスフェロイドを、ガラス-シリコン系の材料で構成した高剛性のロボット統合型マイクロ流体チップ内に導入した後、チップ外部に配置したピエゾアクチュエータを用いてチップ内の力計測プローブを駆動し、細胞を変形した際の画像情報と力情報から、スフェロイドの機械的特性を計測する。その後、チップ外部のポンプを用いた流体制御により、分岐流路にて計測した機械特性に応じて分取操作を行う。システムは、従来のバイオ操作において一般的に用いられている顕微鏡をベースとして計測システム構築し、計測は、顕微鏡に取り付けた画像センサを用いることで、スフェロイド変形時の時間的な反力の変化を計測する。

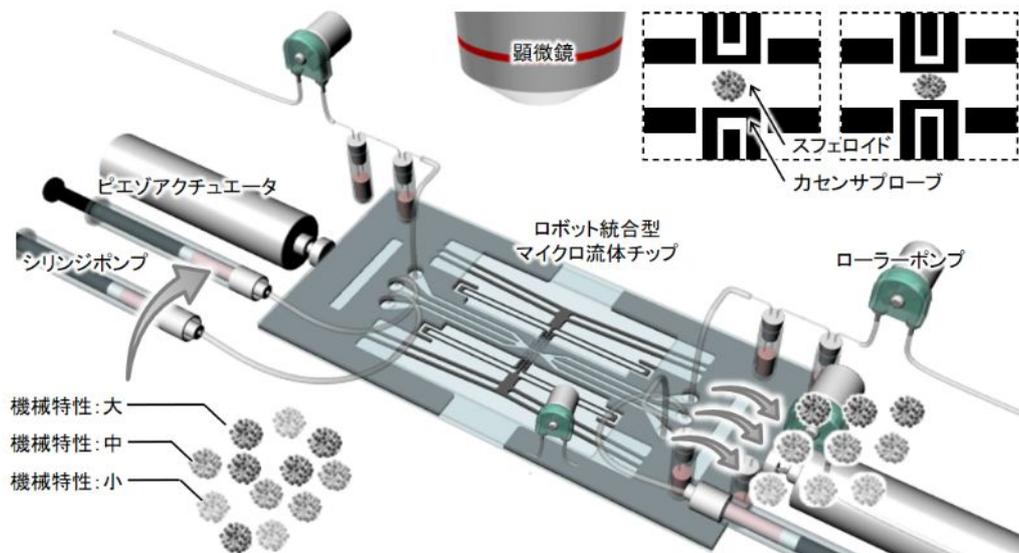


図1 提案する、機械指標活性型スフェロイドソーティングシステムのコンセプト図

3. 研究の方法

本研究では、機械指標活性型スフェロイドソーティングシステムの構築にあたり、大きく以下の3つ技術について研究を行った。

(1) ロボット統合型マイクロ流体チップの設計・作製技術

図2に本研究で開発した、ロボット統合型マイクロ流体チップのプロセス図および作製例を示す。図2(a)に示すように、従来マイクロ流体チップの作製技術として、従来多く用いられてきたポリジメチルシロキサンの樹脂をベースとしたマイクロ流体チップに代わり、MEMS技術を用いて、ガラス-シリコン系の材料で構成した高剛性なマイクロ流体チップを用いた。これにより、ソーティングのための流体制御による圧力変動に対してロバストなマイクロ流路を作製することが可能となるとともに、高精度なマイクロ流体チップと、梁構造を有する力センサプローブを一括で作製することが可能である。

力センサは、梁の変形を顕微鏡に取り付けた CCD カメラにて計測する方式をとるが、反力の高速計測のためには、計測の分解能を保ったまま、梁の剛性を向上させる必要がある。そこで、プローブに格子上のパターンを付与し、この格子と CCD カメラの画素子の格子からモアレ縞を発生させ、高分解能な位置計測をする方式を統合した。これにより、力計測の分解能を保ったまま、梁の剛性を向上させることが可能であり、ハイスループットな計測の実現が可能である。

また、マイクロ流体チップ内の力センサプローブを用いて、スフェロイドの機械特性計測を行うためには、培養液導入時のマイクロバブルを取り除くための機能が必要である。そこで、図2(b)および2(c)に示すように、チップ上面のガラス基板の一部に窓構造を設けることで流路を外部へと解放し、送液によりマイクロバブルを取り除く機構とした。

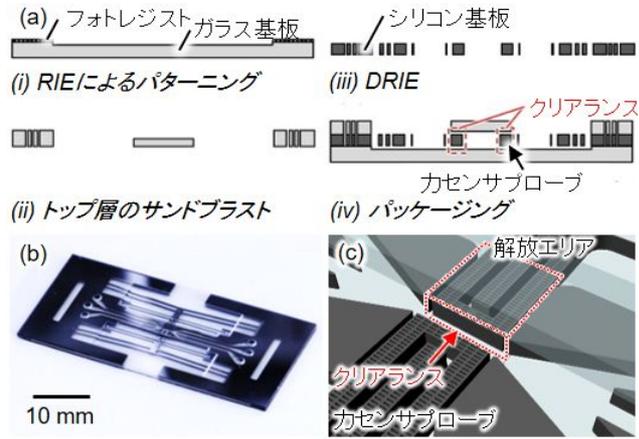


図2 ロボット統合型マイクロ流体チップの作製。(a)プロセスフロー、(b)作製したマイクロ流体チップの写真、および、(c)クリアランスの概略図。

(2) スフェロイドの機械的特性計測自動化のための、流体制御技術

図2(c)で示したように、開発したロボット統合型マイクロ流体チップは、力センサプローブを駆動するために、力センサプローブの周りには、クリアランスが存在し、スフェロイド搬送用のマイクロ流路は、外部に一部解放された領域へと接続されている。このことから、マイクロ流路中のスフェロイドを、外部ポンプを用いて位置決めした際には、このクリアランスを流れる流体により、力センサプローブにせん断力が印加され、力センサプローブが駆動されることになる。詳細は文献((S. Sakuma, et al., IEEE Robot. Autom. Lett., 4(3), pp.2973-2980, 2019))を参照されたいが、開発したロボット統合型マイクロ流体チップにおける、スフェロイドの位置決め操作のための、流体制御の設計論を構築するために、図3に示す流体制御モデルを考案した。このモデルにおいて、流体制御時の力センサプローブの変位は式(1)で表される。

$$w_{p,h} = \frac{2\mu w_{sv}(2h_{sv} + l_p)(h_{pv} + 2h_{sv} + 2l_{sv} + l_p)}{k_p(l_p h_{pv} + 2l_{sv} h_{sv} + 2l_{sv} h_{pv})^2} (Q_{Cont1} + Q_{Cont2}) + w_0 \quad (1)$$

ここで、 $Q_{Cont1} + Q_{Cont2}$ はマイクロ流路への制御流体の導入量を示す。すなわち、スフェロイドの位置決め操作時に、流体制御により力センサプローブが駆動され、スフェロイドに対して、挟み込み動作をすることを避けるため、 $Q_{Cont1} + Q_{Cont2} > 0$ を常に満たす状態での流体制御が求められる。そこで、スフェロイドの位置決め操作のために、2系統のシリンジポンプを利用し、常に $Q_{Cont1} + Q_{Cont2} > 0$ となる制御系を構築した。

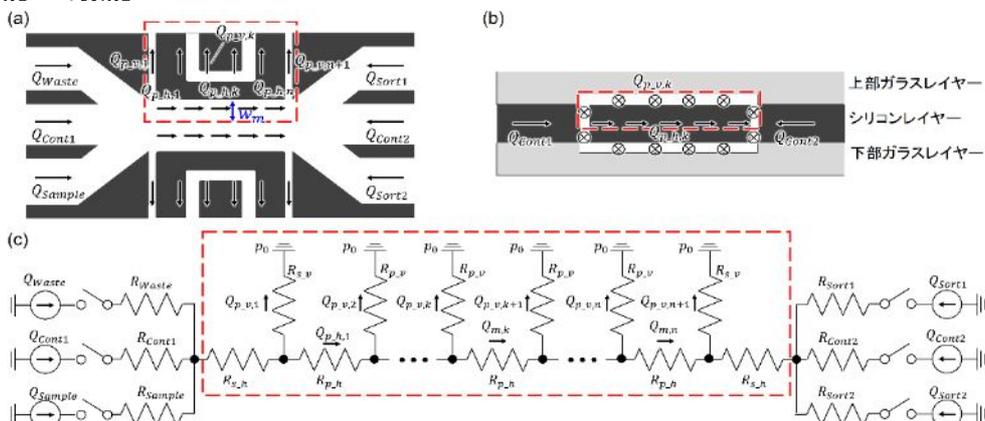


図3 流れ解析モデル。計測領域の(a)上面図および(b)側面図、および、(c)等価回路モデル。

(3) スフェロイドの機械的特性の指標化

スフェロイドの機械特性として、ゴム弾性理論に基づいて回転楕円体の変形モデルを導入し、ヤング率の計測を行った。ゴム弾性理論に基づき、統計的および熱力学的理論に基づく変形を考えることで、変形下の球のヤング率の非線形性が可能である。文献(S. Sakuma, et al., IEEE Robot. Autom. Lett., 4(3), pp.2973-2980, 2019)を参照されたいが、式(2)を利用することで、拡張ヘルツ接触理論による圧縮操作から導出された、球表面上の点の動きを解析することで、非線形特性を有するゴム弾性球の初期ヤング率を計算することが可能である。

$$\begin{cases} z = R - \sqrt{R^2 - r^2} \\ \frac{d}{2} = \frac{3(1-\nu^2)}{4E_0} \left(1 + \frac{Br^2}{8R^2}\right) \frac{P}{a'} - \frac{f(a')A}{\pi E_0} \left(1 + \frac{Br^2}{5R^2}\right) P \\ R - \sqrt{R^2 - r^2} = AP \left\{ \frac{3(1-r^2)}{8E_0 r} \left(1 - \frac{Br^2}{2R^2}\right) + \frac{Bf(r)r^2}{2\pi E_0 R^2} \right\} \\ a' = r + \frac{A(1+\nu)}{2\pi E_0} \left(1 + \frac{Br^2}{5R^2}\right) \left\{ \frac{\sqrt{z} - \sqrt{2R-z}}{2R\sqrt{2R}} - \frac{(1-2\nu)(2\sqrt{2R}-\sqrt{z}-\sqrt{2R-z})}{\sqrt{2Rz(2R-z)}} \right\} \end{cases} \quad (2)$$

ここで、

$$A = \frac{(1-\xi)^2}{1-\xi+\frac{\xi^2}{3}}, B = \frac{1-\xi^2}{1-\xi+\frac{\xi^2}{3}}, \xi = \frac{d}{2R}, f(a) = \frac{2(1-\nu)R}{(a^2+4R^2)^{3/2}} + \frac{1-\nu^2}{\sqrt{a^2+4R^2}}, R = \frac{D}{2}$$

4. 研究成果

図4に構築したシステムを示す。システムは、3台のシリンジポンプと3台のローラーポンプを有する。シリンジポンプにて、サンプル懸濁液の導入、および、スフェロイドの位置決め操作を行う。また、ローラーポンプにて、複数のスフェロイドが同時に供給された際のアポート操作、および、機械特性計測後のソート操作を行う。

図5に構築したシステムを用いて、式(1)に基づき、マイクロ流路内でマイクロビーズの位置決め操作を行った結果の例、式(2)に基づき、スフェロイドの機械指標計測を行った例、および、MSC スフェロイドとマイクロビーズを混合した懸濁液を用いて機械指標活性型連速ソーティングを行った結果の例を示す。図5(a)および5(b)から分かるように、対象の微粒子を計測部へ搬送した後に、カセンサブローブ部にて位置決めすることに成功した。また、図5(c)および5(d)から分かるように、カセンサブローブを用いて、スフェロイドを大変形させた際のヤング率の計測に成功した。さらに、図5(e)~図5(j)に例を示すように、構築した自動計測・分取システムを用いて、26個のMSCスフェロイドを用いて行い、手動計測のスループットの約2倍となる3.14 spheroids/minを達成した。また、MSCスフェロイドとマイクロビーズの混合溶液を用いたソーティングの基礎評価を行い、MSC: 5個/5個、ビーズ: 5個/5個の、連続した機械指標活性型オンチップソーティングを達成した。

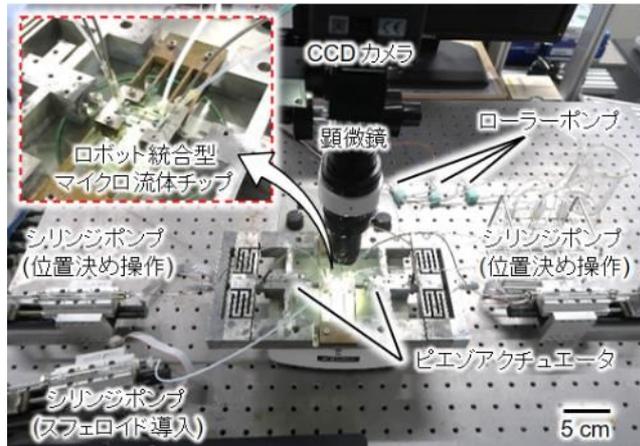


図4 機械指標活性型ソーティングシステム。

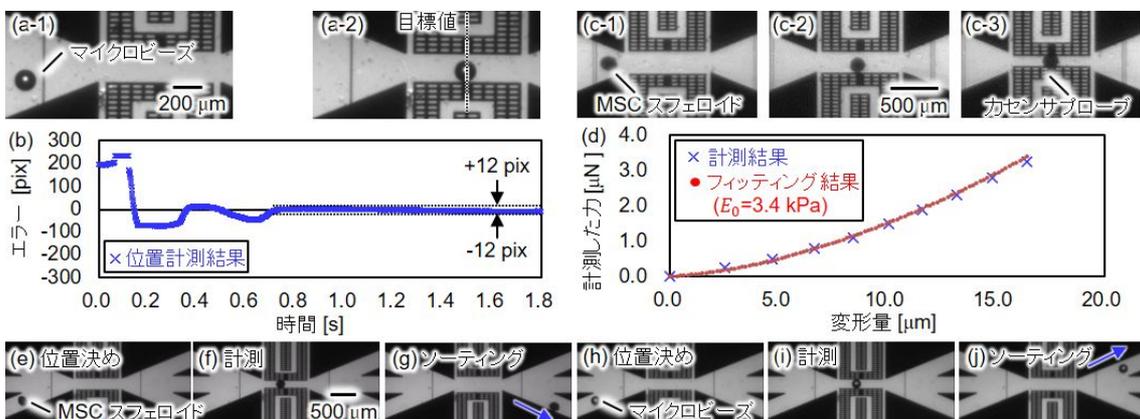


図5 機械指標活性型ソーティングの例。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yusuke Kasai, Shinya Sakuma, Fumihito Arai	4. 巻 4(3)
2. 論文標題 High-Speed On-Chip Mixing by Microvortex Generated by Controlling Local Jet Flow Using Dual Membrane Pumps	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE Robotics and Automation Letters	6. 最初と最後の頁 2839-2846
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/LRA.2019.2921696	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinya Sakuma, Ko Nakahara, Fumihito Arai	4. 巻 4(3)
2. 論文標題 Continuous Mechanical Indexing of Single-Cell Spheroids Using a Robot-Integrated Microfluidic Chip	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 IEEE Robotics and Automation Letters	6. 最初と最後の頁 2973-2980
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1109/LRA.2019.2923976	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件）

1. 発表者名 Yusuke Kasai, Makoto Saito, Shinya Sakuma, Fumihito Arai,
2. 発表標題 Spatiotemporally generated microfluids with the aid of high-speed flow control
3. 学会等名 The 23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Kasai, Shinya Sakuma, Fumihito Arai
2. 発表標題 Spatiotemporally generated microfluids: traveling vortex for on-chip sorting of large particles
3. 学会等名 The 30th 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Saito, Shinya Sakuma, Yusuke Kasai, Fumihito Arai
2. 発表標題 Spatiotemporally generated microfluids: asymmetric flow resistor for on-chip pumping
3. 学会等名 The 30th 2019 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2019) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Makoto Saito, Yusuke Kasai, Hiroki Kumon, Shinya Sakuma, Fumihito Arai
2. 発表標題 High-speed and high-resolution on-chip pumping utilizing asymmetric flow resistors
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (IEEE MEMS 2020) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐久間臣耶, 笠井宥佑, 齋藤真, 新井史人
2. 発表標題 超高速流体が拓く非構造化マイクロフルイズ
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第39回研究会(CHEMINAS 39)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤真, 佐久間臣耶, 笠井宥佑, 新井史人
2. 発表標題 超高速流体制御を用いた層流領域での非対称流生成によるオンチップポンピング
3. 学会等名 第37回日本ロボット学会学術講演会 (RSJ2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐久間臣耶, 笠井宥佑, 新井史人
2. 発表標題 輸送渦の時空間的生成によるオンチップマルチソーティング
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会 (CHEMINAS 40)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤真, 佐久間臣耶, 笠井宥佑, 新井史人
2. 発表標題 定在渦を用いたマイクロ流路の時空間的流体抵抗制御
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第40回研究会 (CHEMINAS 40)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠井宥佑, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 輸送渦の時空間的生成を用いたオンチップソーティング
3. 学会等名 第20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 (SI2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤真, 佐久間臣耶, 笠井宥佑, 新井史人
2. 発表標題 非対称マイクロ流体抵抗を用いたオンチップ流体制御
3. 学会等名 第20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 (SI2019)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kou Nakahara, Shinya Sakuma, Fumihito Arai
2. 発表標題 Toward high-throughput sorting of single spheroids based on mechano-index on a microfluidic chip
3. 学会等名 The 29th Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中原康, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 機械的特徴量に基づいたオンチップ細胞ソーティング
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
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中原康, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 機械的指標に基づくセルソーティングシステム の提案
3. 学会等名 日本ロボット学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kou Nakahara, Shinya Sakuma, Fumihito Arai
2. 発表標題 On-chip cell separation based on mechanical characteristics
3. 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kou Nakahara, Shinya Sakuma, Fumihito Arai
2. 発表標題 Automated on-chip sorting system for separation of spheroid based on the mechanical
3. 学会等名 2017 international symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中原康, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 スフェロイドの機械特性に基づく分離を目指したオンチップソーティングシステム
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第35回研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中原康, 佐久間臣耶, 新井史人
2. 発表標題 細胞の機械特性に基づくオンチップ連続ソーティング, ポスター発表
3. 学会等名 化学とマイクロ・ナノシステム学会第36回研究会
4. 発表年 2017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
---------	---------------------------	-----------------------	----