

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13901

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：23106002

研究課題名（和文）超高速操作による細胞計測と自律誘導モニタリング

研究課題名（英文）Cell Measurement and Monitoring of Self-directed Induction Using Ultrahigh-speed Manipulation

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） 99,300,000 円

研究成果の概要（和文）：マイクロ流体チップによる細胞のマルチパラメータ計測を目的として、対象の力学的特性に応じたチップ内の可動部等の設計論及び加工技術の確立、モアレを用いた光学顕微鏡の解像度の限界を超えた位置計測精度を実現した。複数の生理環境を計測するセンサのチップ内構築及び計測技術を確立した。そしてこれらを用いた細胞やスフェロイドの硬さ指標や細胞-環境間相互作用計測を提案した。また細胞システムの調整制御として、血管組織の灌流培養システムを構築し、長期的な機械刺激が弾性線維形成に有効なことを示した。以上の成果は、細胞特性と力学的及び化学的マルチパラメータの関連の解明と組織構築の効率化等の重要な基盤技術となると考える。

研究成果の概要（英文）：We studied the design and fabrication method of microfluidic chip integrating microactuator and microsensor to measure the multi-parameter of cell. We developed the precise measurement method of probe position with a sub-pixel level of resolution using the phase detection of moire fringe. And we developed the microfluidic chip having multi fluorescence sensor pillars for measuring several physiological parameters such as pH, temperature, and Calcium ions. By using these technologies, we measured the stiffness of cell and spheroid in high-speed, and time-course variation of physiological conditions was measured in the chip. Moreover, we developed rapid fabrication method of multilayer tubular tissue as a model artery, and constructed the perfusion culture environment. By using this model artery and culture system, we found the long-term mechanical stimulus to model artery is effective to form the elastic fiber.

研究分野：機械工学

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 バイオ関連機器 細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

生体内で行われている細胞の分化、増殖、組織形成の過程はいまだ十分に理解されていない。このため、*In vitro* 系で行える実験は、シャーレ上の培養に代表されるような組織構築のためのごく初期のプロセスに過ぎず、再生医療や医薬品の研究開発の現場では、*In vivo* 系での組織培養や、動物実験が前提となっている。今後、再生医療や創薬開発をより広く社会に普及していくためには、実験条件を調整しやすい *In vitro* 系での組織構築技術を確立することが重要となる。

しかし、従来の *In vitro* 系の実験系は以下のような問題点があった。

1. 単一細胞レベルの実験が困難で、細胞ごとの特異性を解析できないこと、
2. 細胞培養における細胞選別は一部の熟練者のスキルに依存しており、定量化されていないこと、
3. 細胞固有のパラメータ計測は細胞のサイズや表面マーカーなどに限られており、データベースとしては不十分であること、
4. 細胞の電気的、力学的計測の研究がなされているが、大量の細胞を高速に計測できないため、全体像がつかみにくいこと、
5. 細胞のマルチパラメータ計測に基づいた環境条件との相互作用が解析できず、データベースの活用が困難であること

このため、*In vitro* 系での実験では効率的に組織構築を行うことが困難である。一方、微細加工技術が進歩したことで、*Lab-on-a-chip* 技術によって細胞をマイクロ流体回路の中で個別に操作し、その周りの環境を制御しながら細胞の応答を計測・評価することが可能となってきた。この技術を発展し、利用することで、従来の *In vitro* 系での実験系で問題となっていた上記課題を解決できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では細胞特性と細胞システムの活動を自律誘導するための最適な環境場とダイナミック刺激との関連を明らかにすることを目的として、これに必要な基盤技術に関する研究を進める。上記課題に対しては以下のアプローチをとる。

1. 単一細胞レベルでの実験を基本とし、オンチップで細胞を操作、観察しながら細胞ごとの特異性を解析する。
2. 細胞培養における細胞選別には細胞固有のマルチパラメータ計測を基盤とし、これまで未知となっている力学的、電気的パラメータを計測する。また、熟練者のスキルとの比較を行うことで、パラメータの重要性を評価する。

3. 細胞固有の力学的、電気的パラメータや細胞の表面マーカー、細胞周期、イオン濃度などを計測し、データベース化する。
4. 細胞のマルチパラメータを高速に計測し、大量のサンプルを短時間で計測できるシステム技術を確立する。
5. 細胞のマルチパラメータ計測データを参照しながら環境条件との相互作用を解析するシステム技術を確立する。

個々の細胞の特性や状態を把握するために、マイクロ流体回路の中でナノ・マイクロロボットを利用するオンチップロボティクスを基盤技術とする。これまで、*Lab-on-a-chip* 技術は流体の混合を前提とした化学的な操作が主流であるが、本研究ではオンチップで物理的操作技術を導入することで、計測センサの空間分解能および局所環境条件の制御性を向上することを特色とする。これまでほとんど計測されていない細胞固有の力学的、電気的パラメータをフロー方式で高速に計測する技術を確立することで、大量の細胞のデータベースを構築し、環境条件との相互作用を調査することで、これまで未知となっている細胞固有の特性を明らかにし、この知見をもとに新しい *In vitro* 系培養技術を確立する。

## 3. 研究の方法

本研究では、大きく A、B の 2 つのテーマに分割し、(1)～(7)の研究項目に関して合計 7 名で研究を行った。

### A. 細胞のマルチパラメータ計測と評価

可動部を有するマイクロ流体チップを製作し、可動部を動かして細胞を変形させることで細胞の硬さを計測する。このとき、2,000Hz オンライン高速ビジョンを用いて高速化する。また、マイクロ流体チップを製作し、フロー方式で連続的に電気特性を計測する機能を組み込む。

下記の項目について研究を実施する。

- (1) フロー式細胞マルチパラメータ計測
- (2) フロー式細胞マルチパラメータ計測のための校正用マイクロビーズの作成と評価
- (3) 培養細胞の特性評価と分離
- (4) データベース構築

### B. 細胞と環境の相互作用の解析

細胞アッセイと自律誘導制御のためのマイクロ流体チップを製作し細胞と環境の相互作用を解析する。

下記の項目について研究を実施する。

- (5) 特定細胞の高速分離
- (6) 細胞の培養環境制御
- (7) 細胞システムの調整制御

### C. 計画研究総括・まとめ

#### 4. 研究成果

##### (1) モアレ干渉縞による高精度細胞計測 フロー式細胞マルチパラメータ計測

細胞の力学的特性計測のための、細胞の押し込み時の反力を計測するシステムを図1に示す。このシステムは、マイクロ流体チップ、外部駆動源としての piezo アクチュエータ、光学顕微鏡で構成されている。マイクロ流体チップ上で、細胞はインレットから投入され計測点まで流体圧によって搬送される。計測点に達した細胞は、流路に配置されたプローブにより変形を受け、その変形量と反力が計測される。一方、細胞が変形を受けた際の細胞から受ける反力は、流路の反対側の壁面に配置された力センサによって計測する。この力センサは、プローブとばね定数が既知の梁の構造で構成されている。これより、細胞から受ける力を、プローブの初期位置からの変位を利用して計測できる。

計測精度を決定づける要素は、梁構造のばね定数と、プローブの変位を観測する際の分解能となる。従来手法では、プローブ先端を画像処理により検出してきた。分解能は投影光の波長 500 nm 程度であるから、10 nN 付近の計測レンジを想定し、梁のばね定数を 1 nN/μm に設定した。しかしこの方法では、

- ・梁構造が加工限界に近く、非常に脆い
- ・共振点が低く、動的な入力に対応できない
- ・精度が不十分であり、向上を望めない

などの問題点がある。

本研究では、センサの計測分解能の問題を解決する手段として、モアレ干渉縞いた手法を提案した。サンプリングモアレ法を応用し、プローブの後段に形成した格子構造と、観測用のイメージセンサの素子を利用することで、干渉縞を発生させ、さらに位相解析を行うことで、干渉縞を発生させる機構に、高度な加工精度や複雑さを要求されず、簡単かつ高精度な計測分解能を実現できる。

図3に、本稿で用いたマイクロ流体チップを示す。チップは、Silicon-on-Insulator (SOI) ウェハに設計したデバイスが、2枚のガラス基板でパッケージングされた構造になっている。従来のマイクロ流体チップと比較し剛性を10倍程度高く設計した。

計測対象として、動物系細胞である MDCK (Madin-Darby canine kidney) 細胞を利用して計測した結果を図4に示す。計測の空間分解能は 65 nm で反力換算で 0.45 nN に相当する。これは従来手法と比較して、約 10 倍高精度である。変形率 15% 以下の範囲で Hertz の接触理論を用いて算出した弾性定数は、およそ 450 Pa であった。

以上に示したように、フロー系において細胞の力学的特性を高精度に計測可能なシステムを実現した。今後は計測精度の向上と共に、より多くの細胞を計測することで、生体機能の解明、利用に貢献できると考えられる。

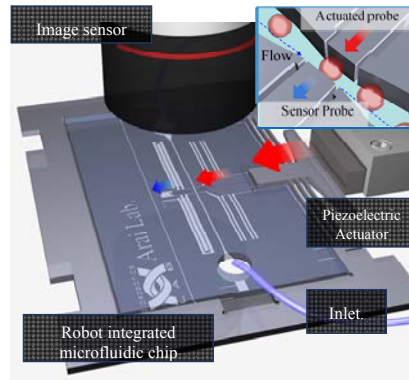


図1 システムのコンセプト図

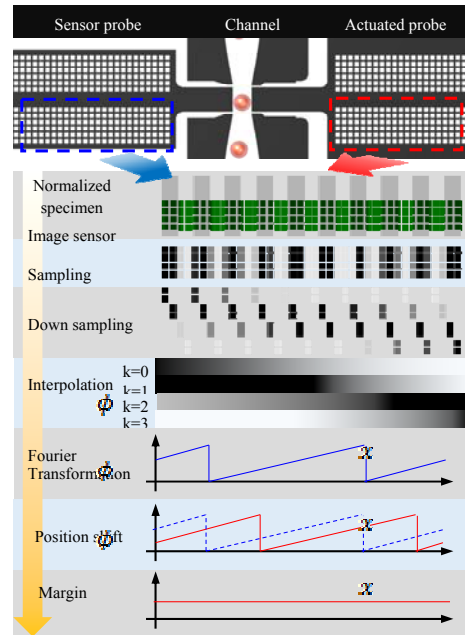
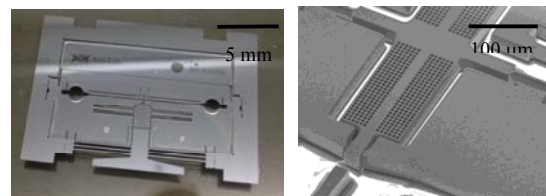


図2 モアレ計測の概念図



(a) Entire image of the microfluidic chip (b) Grating structure for moiré fringe

図3 計測用マイクロ流体チップ

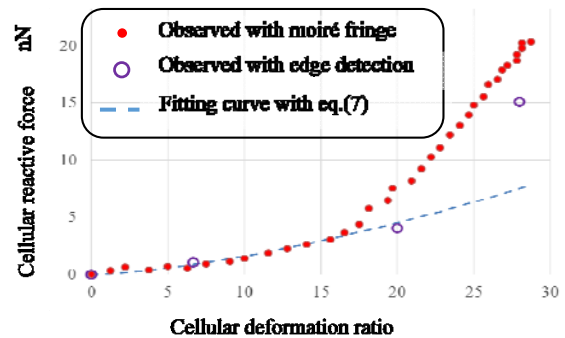


図4 細胞の力学的特性計測結果

(2) 高速駆動型磁気駆動マイクロロボット  
による高速細胞操作・分離

図5に、外部磁場で高速駆動する磁気マイクロロボットによる細胞操作・分離のコンセプト図を示す。磁気駆動マイクロロボットは微細加工技術で成形した本体の一部に強磁性体のニッケル(Ni)を電鍍で堆積させたものである。ツール先端の形状は任意の形状に加工できるため、細胞操作や分離に適した形状のものを利用可能である。駆動用の磁気回路は図1(b)に示すように永久磁石の磁極が水平になるように配置したものであり、これによりマイクロロボットが下向きに引っ張られがタ基板との摩擦が増えることが抑制され、高速駆動及びデッドバンドの抑制が実現できている。

本研究では、磁気マイクロロボットの底面をリブレット形状に加工することで、よりガラス面との摩擦を低減し、高速・高精度に駆動可能とした。図6に作製した磁気駆動マイクロロボットを示す。図6(a)はマイクロロボット底面のリブレット表面の走査型電子顕微鏡(SEM)写真である。リブレットの深さは8  $\mu\text{m}$ 、深さは約5.7  $\mu\text{m}$ である。マイクロロボットの厚さは200  $\mu\text{m}$ である。

図7に磁気駆動マイクロロボットの周波数応答特性を評価した結果を示す。評価は一軸の駆動で行い、 $\pm 0.5 \text{ mm}$  のストローク、0.1~100 Hz の周波数帯域でステージを駆動させることで行った。マイクロロボットの位置は高速度カメラで1000 frames/s で計測した。結果として、駆動方向に水平にリブレットを加工したマイクロロボットは90 Hz (最高速度: 282.6 mm/s) までのステージの駆動に追従し、駆動方向に垂直にリブレット加工したマイクロロボットは70 Hz まで追従した。一方、リブレットを加工しなかったマイクロロボットは10 Hz までしか追従できず、リブレットの加工により、磁気駆動マイクロロボットの久津特性を大きく改善したことを確認した。

この磁気駆動マイクロロボットを用いた細胞のソーティングを行った実験結果を図8に示す。図8(a)に示すように一番下の流路から細胞を導入し先端を加工したマイクロロボットで捕捉後、目的の流路まで搬送し流体力でリリースするものである。用いた細胞はウシ卵子で、流路に流れる流体の速度は20 mm/s とした。図8(b)に示すように、導入されたウシ卵子をマイクロロボットで捕捉し、目的の流路にソーティングすることに成功した。

以上のように、高速に駆動可能で単一細胞単位での操作・分離なオンチップ細胞操作システムを実現した。本システムを用いることで、特性計測した細胞を迅速に分離し培養観察することが可能となる。

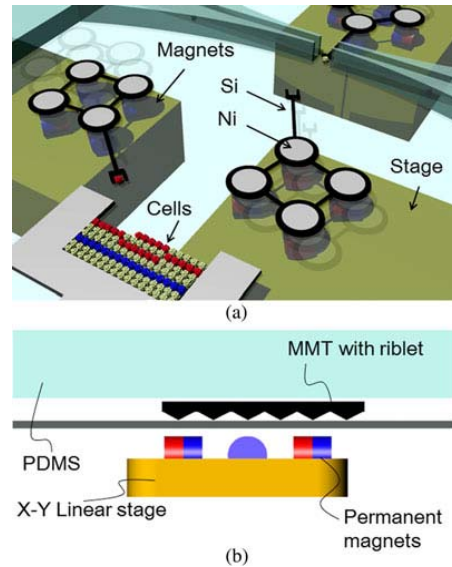


図5 高速駆動磁気マイクロロボットの概念図

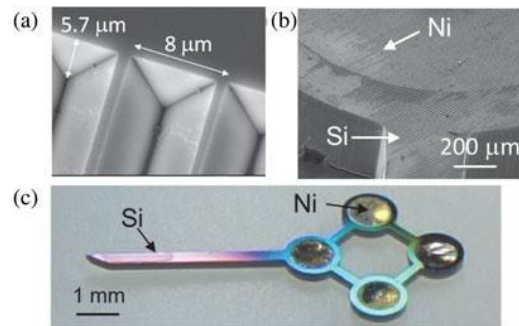


図6 磁気駆動マイクロロボットの形状

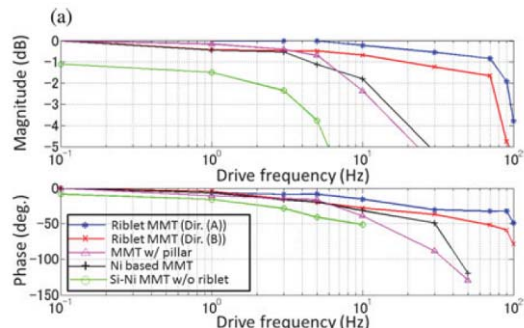


図7 マイクロロボットの周波数応答特性

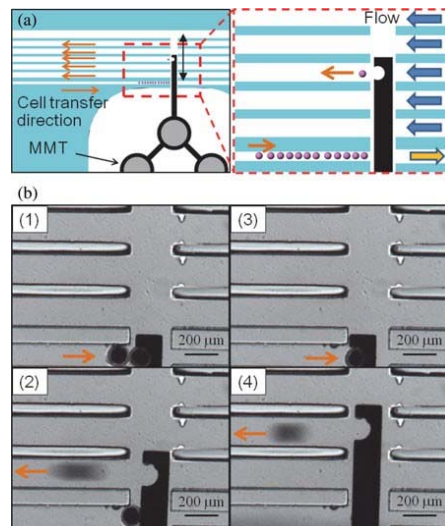


図8 細胞の高速ソーティング実験結果

(3) マルチ蛍光センサピラーによる細胞環境計測用マイクロ流体チップ

マイクロ流体チップ内の複数の生理環境条件の分布及び変化を同時に計測可能なセンサの作製を行った。本研究では、骨芽細胞の分化と、リン酸オクタカルシウム(OCP)のヒドロキシアパタイトへの転換にともなうカルシウムイオンの吸収及びリン酸イオンの放出との相互作用解析を対象とした。

図9にpH, 温度, カルシウムイオンを同時に計測可能なセンサピラーが配置されたマイクロ流体チップの概念図を示す。OCPと細胞はマイクロ流体チップ内において壁で隔離されており、壁の隙間から拡散でチップ中を移動する各種イオンやチップ中の温度分布を中央の流路の蛍光センサ群で計測する。

カルシウムイオン濃度の計測にはFluo-3を、リン酸イオン濃度の変化はpHで間接的に計測するためFITCを、温度の計測には量子ドット(CdSe/ZnS)を用いた。センサは液透過を有するため、培地中のイオン濃度等を計測できる。蛍光色素の励起波長は全て488nmである。センサの形状を計測対象ごとに換えることで、一つの励起光で複数の環境を同時に計測できる。従来の蛍光マルチ計測では、対象毎に異なる励起波長を用いたが、計測対象数が励起波長数に制限される課題があったが、本手法では微細加工技術で形状の異なるセンサの集積化が可能な利点がある。

図10にマイクロ流体チップ及び蛍光センサピラーの透過光画像及び蛍光画像を示す。カルシウムイオンセンサ, pHセンサ, 温度センサの直径は、それぞれ20µm, 15µm, 10µmとした。チップにOCPを導入し、OCPの転換を促進するフッ化物イオンを100ppm含んだ生理緩衝水溶液の導入後のチップ中のカルシウムイオン濃度, pH, 温度変化を計測した結果を図11に示す。溶液中のカルシウムイオン濃度の低下, リン酸イオン増加によるpHの低下, 温度変化がないことが計測された。また、図12に示すように本チップ中に細胞を導入し培養できることを確認した。今後は骨芽細胞の分化とOCPの相互作用の解析を行い、分化に適した生理環境や力学的刺激等の各種データベース構築に用いる。

(4) 血管組織の構築と機械的刺激による細胞システムの調整制御

細胞システムの調整制御として、円筒状かつ多層の血管組織の構築手法の実現、灌流培養システムの構築を行い、これらを用いて、体内を模倣した周期的な力学刺激を通じた弾性繊維の組織形成機序の評価を行った。血管組織の作製方法として展開積層バイオアセンブリ(BEL)を提案し、従来の平面培養では困難であった多層の円筒状組織の構築に成功した。作製した血管組織と灌流培養システムを用いて、長期的な拍動刺激を印加したところ、弾性繊維の発現を示すマーカーの発現が顕著に増加したことを確認した。

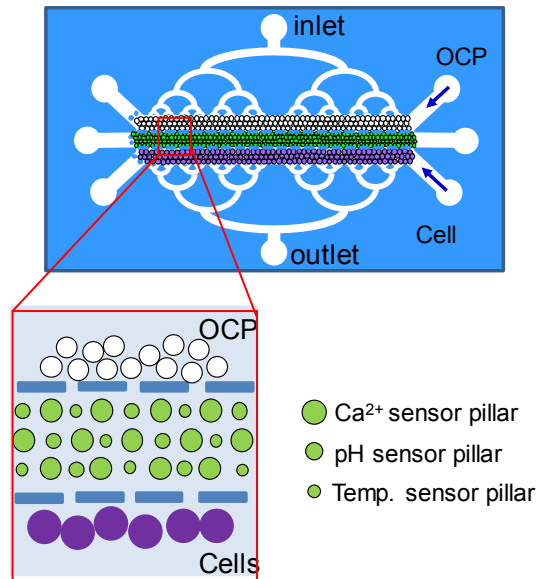


図9 蛍光センサピラー集積マイクロ流体チップの概念図

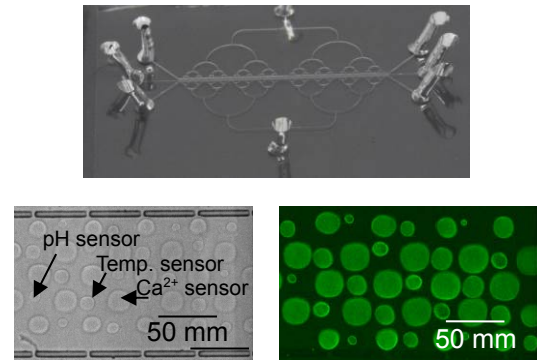


図10 チップ及び蛍光センサピラーの画像

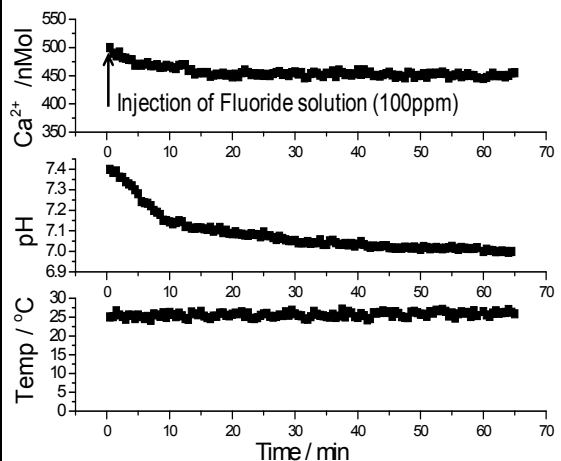


図11 F-を100ppm添加後のチップ内環境の経時変化の計測結果

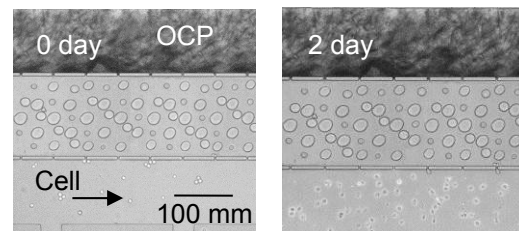


図12 チップへの細胞導入と培養

## 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 14 件)

- ① On-Chip Method to Measure Mechanical Characteristics of a Single Cell by Using Moiré Fringe, H. Sugiura, S. Sakuma, M. Kaneko, F. Arai, *Micromachines* 査読有, Vol. 6, No. 6, pp. 660-673, 2015.  
DOI:10.3390/mi6060660
- ② Microfluidic perfusion culture system for multilayer artery tissue models, Y. Yamagishi, T. Masuda, M. Matsusaki, M. Akashi, U. Yokoyama, F. Arai, *Biomicrofluidics*, 査読有, Vol. 8, 064113, 2014.  
DOI: 10.1063/1.4903210
- ③ High-Speed Magnetic Microrobot Actuation in a Microfluidic Chip by a Fine V-Groove Surface, M. Hagiwara, T. Kawahara, T. Iijima, F. Arai, *IEEE Transactions on Robotics*, 査読有, Vol. 29, Issue 2, pp. 363-372, 2013.  
DOI: 10.1109/TR0.2012.2228310
- ④ On-chip microrobot for investigating the response of aquatic microorganisms to mechanical stimulation, T. Kawahara, M. Sugita, M. Hagiwara, F. Arai, H. Kawano, I. Ishikawa, A. Miyawaki, *Lab on a Chip*, 査読有, Vol. 13, Issue 6, pp. 1070-1078, 2013.  
Doi: 10.1039/c2lc41190c

[学会発表] (計 79 件)

- ① Hirotaka Sugiura, Shinya Sakuma, Makoto Kaneko, Fumihito Arai, On-chip Measurement of Cellular Mechanical Properties Using Moiré Fringe, 2015 IEEE International Conference on Robotics and Automation, 2015 年 05 月 28 日, シアトル, アメリカ
- ② Keitaro Ito, Shinya Sakuma, Masaki Kimura, Takanori Takebe, Makoto Kaneko, Fumihito Arai, Stiffness-Index Map Based on Single Cell-Spheroid Analysis Using Robot Integrated Microfluidic Chip, 29th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, 2016 年 01 月 27 日, 上海, 中国

[図書] (計 1 件)

- ① *Micro-Nanorobotic Manipulation Systems and Their Applications*, Toshio Fukuda, Fumihito Arai, Masahiro Nakajim, Springer, 2013, 334.

[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 (計 2 件)
  - 「新井研究室研究紹介」ホームページ  
<http://www.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/research/research.html>
  - 「新学術領域超高速バイオアセンブラ」ホームページ  
<http://bio-asm.jp/>

アウトリーチ活動 (計 8 件)

- ① 新井史人, “未来の医療ロボットを創る！ーバイオニックな視点からみた最先端技術の紹介ー”, Special Lecture, 名大カフェ, 2013 年 11 月 21 日
- ② 新井史人, ナノ・マイクロビジネス展にて展示, 2014 年 4 月 23~25 日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ③ 新井史人, ナノ・マイクロビジネス展にて展示, 2015 年 4 月 22~24 日, パシフィコ横浜 (横浜)

新聞報道 (計 2 件)

- ① 新井史人, 日刊工業新聞, 2012 年 11 月 16 日 名大、卵子から細胞核を効率除去するチップ開発
- ② 新井史人, 日経産業新聞 11 面 (先端技術面トップ記事) 2013 年 12 月 19 日, 鶏卵使って手術訓練

基調・招待講演 (計 22 件)

- ① F. Arai, “Microrobots in Spotlight for Evolution of Biomedicine”, MEMS: 25th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems, (Paris, France), Jan. 2012. (Plenary)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 史人 (ARAI, Fumihito)  
名古屋大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 90221051

(2) 研究分担者

川原 知洋 (KAWAHARA, Tomohiro)  
九州工業大学・若手研究者フロンティア研究アカデミー・准教授  
研究者番号: 20575162

丸山 央峰 (MARUYAMA, Hisataka)  
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授  
研究者番号: 60388743