

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K13909

研究課題名(和文) 振動誘起流れによる非接触三軸姿勢制御を用いた卵細胞の非侵襲活性評価への挑戦

研究課題名(英文) Challenge of Noncontact Quality Evaluation of Oocyte with Noncontact 3D Attitude Control Using Vibration-induced Flow

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、卵細胞の機械的特性の異方性を非侵襲に計測するために、マイクロ流体チップにマイクロピラーをパターンニングし、振動誘起流れを用いることで、卵細胞の非接触姿勢制御技術に取り組んだ。振動誘起流れを用いることで、開空間を有するチップを用いた細胞操作および計測が可能となり、卵細胞のチップ内への導入・搬送・および姿勢制御についてそれぞれ実証実験を行った。さらに、マイクロ流体チップにプローブと力センサを統合し、プローブを用いて卵細胞を変形させた際の反力を計測することで、卵細胞の硬さ計測に成功した。

研究成果の概要(英文)：To measure the mechanical properties of oocytes non-invasively, we focused on the attitude control of an oocyte on a chip. Micro-pillars are fabricated on a surface of microfluidic chip, and the vibration is applied to them. The local flow is generated around pillars. We call it vibration-induced flow. We used vibration-induced flow to transport the target cell to the measurement point and to control its attitude. We succeeded in transportation, positioning and 3D rotation of mouse oocytes. We integrated a pair of a probe and a force sensor in the microfluidic chip for measurement of the mechanical properties of oocyte. The reactive force of target cell was measured with its deformation ratio. We succeeded in measurement of Young's modulus of mouse oocytes by using the robot integrated microfluidic chip. We confirmed the feasibility of basic principles of the microrobot system for the quality evaluation based on mechanical characteristics of oocyte.

研究分野：知能機械学・機械システム

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 機械力学・制御 細胞・組織

4. 研究成果

(1) 卵細胞の導入・搬送および姿勢制御

マイクロ流体チップ上で、非接触で卵細胞の搬送・位置決めを行うための基盤技術を開発した。

卵細胞の導入・搬送：図 2(a)および(b)に示すように、PFA チューブを用いてチップ内に卵細胞を導入した。PFA チューブはシリンジに繋がれ、流量の制御が可能である。図 2(c)のように PFA チューブを取り除いても卵細胞を失うことなくチップ内に導入できることを確認した。なお、この際の卵細胞導入成功率は、100 % (9 cells / 9 cells)であった。流路に導入された卵細胞を、振動誘起流れによって搬送した。搬送の様子を図 2(d)-(f)に示す。チップ上に作製したマイクロピラーにより発生した振動誘起流れにより卵細胞が搬送されていることが分かる。さらに、図 3 は、振動誘起流れのためのピエゾアクチュエータへの入力加振電圧と卵細胞の搬送速度の関係を表したものである。ここで、加振周波数は 300 Hz とした。この実験から、印加電圧を大きくすることで、搬送速度を大きくすることが可能であり、最大で約 78 $\mu\text{m/s}$ の速度で搬送できることを確認した。

卵細胞の姿勢制御：図 4 に卵細胞の姿勢制御のコンセプトおよび、結果の一例を示す。チップ外部に配置した三軸のピエゾステージを用いて、チップに振動を印可することで、チップ内の卵細胞を回転させることに成功した。焦点面内の回転方向は、 64.7 ± 4.0 degrees/s、焦点面外の回転方向は 3.5 ± 2.1 degrees/s での回転に成功した。この縦回転と横回転を組み合わせることにより、卵子の三次元的な姿勢制御の可能性を示した。

(2) 偏光顕微鏡を用いた卵細胞観察

卵細胞の活性を非侵襲に評価するために、偏光顕微鏡を用いて、卵細胞に観察を行った。図 5 に計測した偏光画像を示す。透明体と卵細胞の細胞質部との間に、多少のリターダンス（位相差）の差異が見られ、また、卵細胞の内部に大きなリターダンスの分布がみられるが、卵細胞の個体を評価する実験において、透明体の密度指標を得るまでには至らなかった。

(3) 卵細胞の機械特性計測

振動誘起流れにより、計測部まで搬送した卵細胞の機械的特徴量計測を行った。実験には、解冻後 1 時間が経過したマウス卵子を用いた。卵子をプローブにより変形させた時の力センサの変位量からその反力を計算した。プローブを駆動し、卵子が力センサとプローブに接触した点を計測開始点と設定し、そこから 5 秒ごとに 1.9 μm (ステッピングモータの 2 ステップ分)ずつ駆動させることで計測を行った。プローブの最大駆動量は 38.4 μm と設定した。図 6 に卵細胞の計測の様子と結果を示す。プローブにより対向する力センサに卵

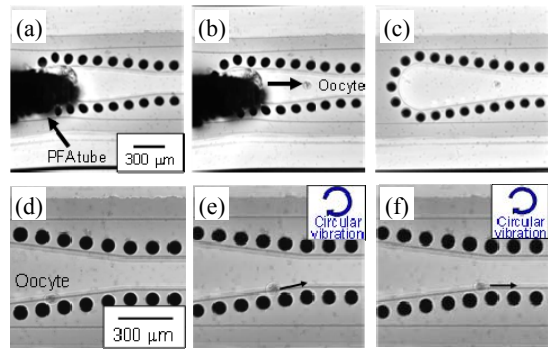


図 2 開空間構造のマイクロ流体チップを用いた、卵細胞の導入および搬送評価の結果。(a)~(c)卵細胞の導入、および、(d)~(f)卵細胞の搬送。

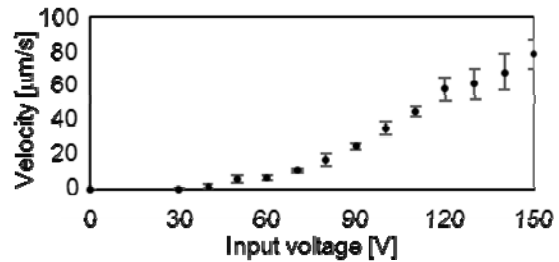


図 3 振動誘起流れを用いた卵細胞搬送における、搬送速度とピエゾアクチュエータへの入力電圧の関係。

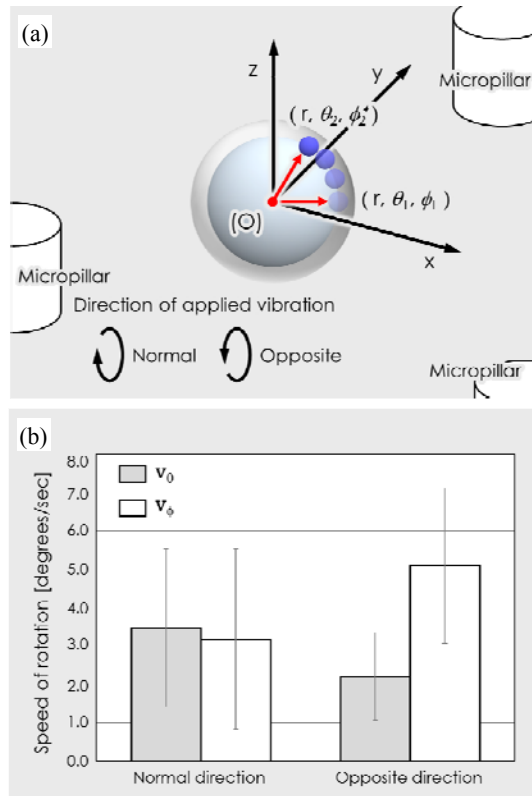


図 4 卵細胞の姿勢制御の一例。(a)軸の名称の定義、および、(b)実験結果。

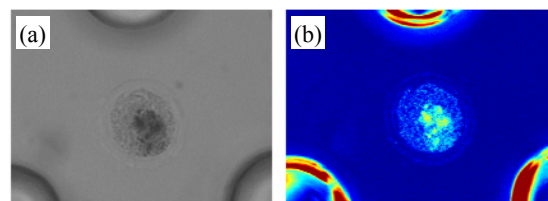


図 5 偏光観察の様子。(a)明視野画像、および、(b)偏光顕微鏡像。

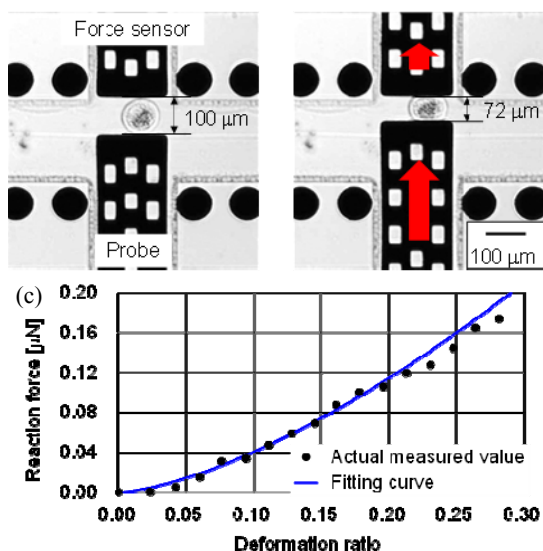


図6 卵細胞の機械特性計測の様子。(a)変形前、(b)変形後、および、(b)力計測結果。

細胞が押し付けられ変形すると同時に、梁構造を有する力センサが変形していることが分かる。以上により、卵細胞の力計測に成功したといえる。

(4)卵細胞の弾性率の計測

卵子を一つの弾性体の球体であると仮定し、ヘルツの接触応力モデルを適用することにより、卵子のヤング率を計測した。卵子の反力は次式で表される。

$$P = \frac{4(D/2)^{1/2}}{3} \cdot \frac{E_C}{1-\nu^2} (\delta/2)^{3/2} \quad (1)$$

ここで、P は卵子の反力、D は卵子の直径、 E_C は卵子のヤング率、 ν は卵子のポアソン比、 δ は卵子の変形量を示す。(1)式により得られたフィッティングカーブは図6の青線で表される。同様の計測を合計9個の卵子に対して行い、計測した卵子の直径とヤング率の平均と標準偏差はそれぞれ、 $99 \pm 4 \mu\text{m}$ 、 $313.7 \pm 77.7 \text{ Pa}$ であった。

以上により、卵子の機械的特性の異方性を調べるために、卵細胞を開空間のチップに導入し、振動誘起流れを用いることで計測部へと搬送に成功した。また、チップ外部に配置した三軸のピエゾステージを用いることで、卵細胞の三次元的な姿勢制御の可能性を示した。さらに、チップに統合したプローブと力センサを用いることで、卵細胞の力計測に成功し、ヘルツの接触応力モデルを適用することで、卵細胞のヤング率を計測した。今後はこれらの技術を統合したシステムを構築し、高精度に卵子の力学的異方性を計測することを目指す。このシステムにより、卵子の質を非侵襲に計測することができ、マウスを用いる生物学研究やウシ、ブタを対象とした畜産業、さらには不妊治療等、様々な分野に貢献することができると期待される。

<引用文献>

[1] Shinya Sakuma and Fumihito Arai, “Cellular Force Measurement Using a Nanometric-Probe-Integrated Microfluidic Chip with a Displacement Reduction Mechanism”, Journal of Robotics and Mechatronics, vol. 25, No. 2, pp.277-284, 2013.

5. 主な発表文等

(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 1件)

[1] Kou Nakahara, Shinya Sakuma, Takeshi Hayakawa, Fumihito Arai, “On-chip transportation and measurement of mechanical characteristics of oocytes in an open environment”, Micromachines, 査読あり, 6(5), 648-659, 2015.

[学会発表] (計 3件)

[1] 中原康, 佐久間臣耶, 早川健, 新井史人, 「振動誘起流れによる卵子の搬送と機械的特徴量計測」, 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス講演会 2015, 京都, 2015年5月。
 [2] 中原康, 佐久間臣耶, 早川健, 新井史人, 「オープンなマイクロ流路環境を利用した卵子の機械的特徴量計測」, 日本ロボット学会 第33回学術講演会, 東京, 2015年9月。
 [3] Kou Nakahara, Shinya Sakuma, Takeshi Hayakawa, Fumihito Arai, “Mechanical Characterization of Oocyte Using an Opened Microchannel Environment”, 25th IEEE Int. Symp. on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2015), Nagoya, Japan, 2015, Nov.

[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.biorobotics.mech.nagoya-u.ac.jp/index.html>

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

なし

(3) 連携研究者

なし