

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18003

研究課題名(和文) ロボット統合型マイクロ流体チップによる卵子機械的特徴量の長期タイムラプス計測

研究課題名(英文) Time-lapse mechanical characterization of a single oocyte by using a robot integrated microfluidic chip

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：未受精卵は、培養時間とともに透明体の機械的特徴量が変化していると考えられるが、従来の卵子評価においての評価指標は顕微鏡明視野画像に基づいた形状パラメータによるものが多く、卵子の機械的特徴量の推移の評価はまだまだ改善の余地が大きい。本研究では、時間とともに変化する卵子の硬さ計測のために、手動膜型ポンプを有するピペット型のマイクロ流体チップ内に、磁気駆動型のオンチッププローブと力センサを統合した、ロボット統合型マイクロ流体チップを用いてマウス卵子の機械的特徴量のタイムラプス計測を行った。

研究成果の概要(英文)：The mechanical characteristics of unfertilized oocytes are thought to have changed with the cultivation time. Since the most of conventional evaluation methods of the transition of mechanical characteristics are based on the indexes provided by morphological analysis, the method of time-lapse mechanical characterization is required to evaluate its transition. In this study, we proposed a pipette-shaped robot integrated microfluidic chip which consist a membrane pump and a pair of indentation probe and force sensor to measure the stiffness of oocyte. By using the constructed measurement system, we succeeded in the time-lapse measurements of mechanical characteristics of mouse oocyte.

研究分野：マイクロ・ナノメカトロニクス

キーワード：マイクロ・ナノメカトロニクス MEMS microTAS 卵子 機械的特徴量 ロボティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、少子高齢化に伴い晩婚化・晩産化が進み、それに伴う不妊治療の件数が増えている。不妊の原因は、半分が男性の精子の不全であり、残り半分は女性の卵子の老化や活性低下と言われている。活性の高い卵子や胚を得るためには、個別の卵子や胚を評価する必要がある。また、ウシ体外受精胚を用いて発生速度や卵割様式を指標とした受胎性の高い胚の選別法が開発されている。このような卵子・胚の研究は、不妊治療だけでなく有用家畜の作出に応用されているが、卵子を受精させてから出産されるまでの個体数は約3割減少するため、良質な卵子や胚を得るための超精密な計測・評価・選別技術が求められている。特に未受精卵は、採卵後の体外培養期間に応じて、授精率が減少すると言われており、採卵後の体外培養中において、培養時間が増加するにつれ透明帯の α -トリプシンに対する溶解時間が長くなる傾向にあるという報告がある。これらのことから、培養時間とともに、透明帯の機械的特徴量が変化していると考えられる。しかし、従来の卵子評価においての評価指標は顕微鏡明視野画像に基づいた形状パラメータによるものが多く、卵子の機械的特徴量の推移の評価はまだまだ改善の余地が大きい。一方で近年、微細加工技術の発展に伴い単一細胞計測技術が発達し、体外受精胚では粘弾性特性や遺伝情報を評価することが可能となってきた。従来我々は、微細加工技術を用い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(ロボチップ)を用いることで、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ウシ卵子の粘弾性特性を連続的に計測することに成功している。ロボチップを用いた計測では、マイクロ流体チップの低レイノルズ数の極めて安定した計測環境を用いることで、ハイスループットかつ定量的な計測を可能となるが、時間とともに変化する未受精卵の硬さを培養中の長期間にわたって細胞の個別計測を行うためには、チップにチューブで接続した外部ポンプを用いて、チップ内の細胞を計測部にたえず位置決めし続ける必要があり、機械的特徴量の長期間タイムラプス計測は困難であった。チューブ接続時の流体外乱による細胞紛失などの問題を解決し、インキュベータにおける培養環境と顕微鏡下での計測環境とを容易に行き来することが出来る、卵子の機械的特徴量の長期タイムラプス計測システムが求められている。そこで、本研究では、図1に示すような、外部ポンプを用いず細胞を搬送可能なピペット型マイクロ流体チップを用いた、卵子の機械的特徴量計測を行った。本研究ではマウス卵子を対象とし、機械的特徴量の長期タイムラプス計測を行うことで、発生率などの生物学的特徴量との関連性を詳細に調査する。卵子品質を評価することで高活性卵子の早期

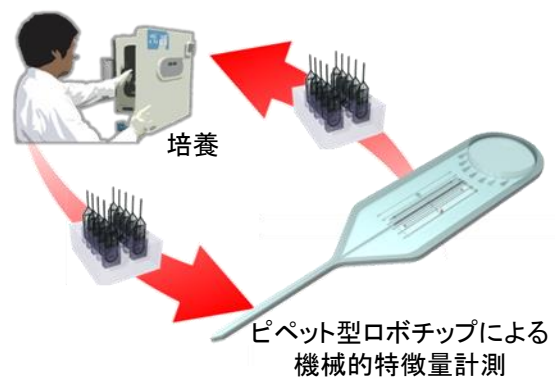
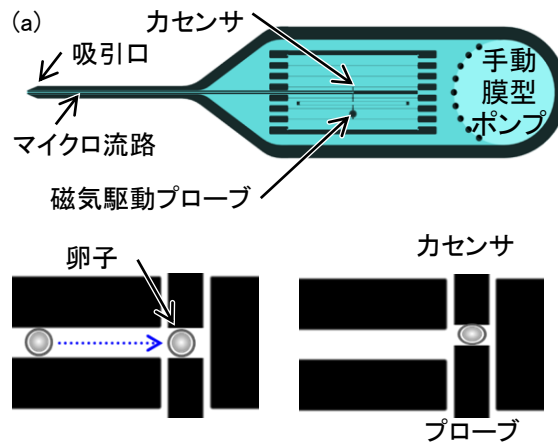


図1 ピペット型ロボチップによる卵子機械的特徴量の計測長期タイムラプス計測



(b-1) 卵子の搬送 (b-2) 機械的特徴量計測

図2 ピペット型ロボチップ. (a)チップの設計, および, (b)卵子の機械的特徴量計測

選別することが可能となり、卵子活性評価に対する指針を得ることができると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、マウス卵子を対象として、機械的特徴量の長期タイムラプス計測を行うことを目的とする。卵子を長期間培養しながら、機械的特徴量を計測するために、ピペット型ロボチップの作製を行い、チューブレスのマイクロ流体チップとすることで、チップ内の安定した環境中で卵子の個別計測および個別管理を行う。チップ内に磁気駆動型プローブと力センサを統合し、顕微鏡下に設置した駆動ユニットを用いることで卵子計測を行う。本研究は、以下の3つの研究項目として実施した。

- (1) ピペット型ロボチップの設計・作製
- (2) 機械的特徴量の指標化および生物学的特徴量指標化
- (3) 特徴量計測システム統合

3. 研究の方法

(1) ピペット型ロボチップの設計・作製：単一卵子を長期培養しながら粘弾性特性、形状特性、色情報等の機械的特徴量をタイムラプス計測するために、図2(a)に示すようなピペ

ット型ロボチップを設計・製作した。チップ作製においては、チップ材料の長期安定性を確保するために、ガラスを用いてシリコン構

造体のロボットをチップ内にパッケージングするガラス-シリコン系のピペット型ロボチップを作製した。

(2) 機械的特徴量および生物学的特徴量指標：ピペット型ロボチップを用いて、細胞の機械的特徴量計測を行った。計測においては、手動膜型ポンプを用いることで、卵子を吸引口からピペッティングによりマイクロ流路内を計測部まで搬送した。計測部において、図 2(b)に示すように、チップ内に統合した磁気駆動型プローブと力センサを用いることで、卵子を変形させた。顕微鏡に取り付けた画像センサにより、卵子の変形挙動と梁型の力センサの変位量を計測することで、卵子の粘弾性特性を計測した。また、発生率などの生物学的特徴量の関連を調べるため文献調査を行った。

(3) 特徴量計測システム統合とデータベース化：磁気駆動プローブを用いた卵子の機械的特徴量計測のために、顕微鏡に画像センサをおよび磁気駆動ユニットを統合し、長期タイムラプス計測システムの構築を行った。

4. 研究成果

(1) ピペット型ロボチップの作製プロセスを確立した。図 3 に、ピペット型ロボチップの作製プロセスを示す。ガラス-シリコン系チップ作製において技術的な課題は、シリコンのドライエッチング時のマイクロローディング効果および基板のチャージアップによる不均一なエッチングであり、これは機械的特徴量計測において、非常に大きな問題である。これらの問題を解決するために、シリコン基板の接合面にあらかじめエッチングのストップ層として、金属薄膜を成膜することで、マイクロ構造体を作製した。図 4 に作製したチップの写真を示す。膜型ポンプの材料には、卵子への酸素供給を考慮し、ポリジメチルシロキサンを用いた。

(2) 機械的特徴量の指標化

卵子の導入

作製した膜型ポンプの特性の評価を行った。ポンプにより吸引・吐出量は、約 28.5 μL であり、卵子をチップ吸引口から計測部へと搬送するための、流量が 0.8 μL であるため、卵子の吸引が可能であることを確認した。図 5 に卵子の吸引の様子を示す。手動膜型ポンプを用いることで、卵子をチップ内のロボチップ内へと導入することに成功した。

卵子の機械的特徴量計測

図 6 に示すように、磁気駆動プローブを用いて、卵子を力センサへと押し付け、その際の

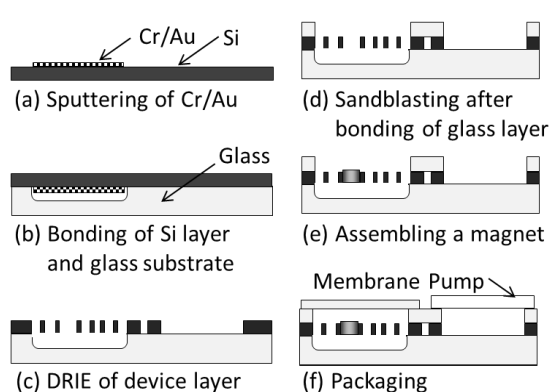


図 3 ピペット型ロボチップのプロセス図。



図 4 作製したピペット型ロボチップ。

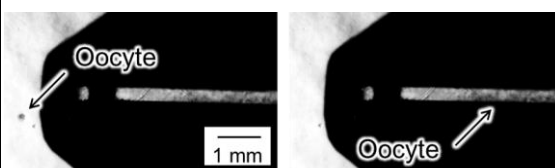


図 5 卵子のチップ内への導入の一例。

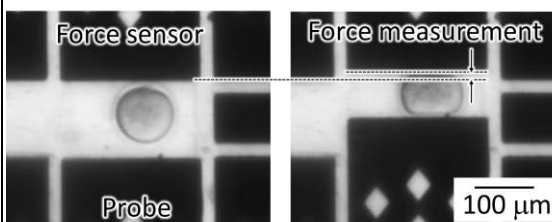


図 6 卵子の機械的特徴量計測の一例。

変形量と反力を計測することで、卵子の機械的特徴量計測を行った。卵子の機械的特徴量の指標化のために、図 7(a)に示すように、卵子を流体で満たされた弾性球殻であると仮定し、弾性球殻の変形モデルを用いることで、透明体のヤング率を計測した。図 7(b)に卵子を圧縮したときの変形率と反力の関係を示す。黒点は実験値、赤点はそのフィッティングカーブを表している。ひずみ量が 0~0.3 の領域において、フィッティングカーブは実験値とよく一致していることが分かる。したがって、以降の実験においては、本モデルを用いて卵子の透明帯のヤング率を算出した。

(3) 特徴量計測システム統合

図8に示すように、顕微鏡に画像センサをおよび磁気駆動ユニットを統合し、タイムラプス計測システムの構築を行った。構築した計測システムを用いて、マウス凍結卵子の機械的特徴量のタイムラプス計測を行った。冷凍卵子を解凍した後、ピペット型ロボチップへと導入し、インキュベータ内で培養を行った。解凍後、0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 hの時間において、インキュベータから、計測システムへとチップを搬送した後、機械的特徴量を計測し、またインキュベータ内で、培養を行った。一度の計測に要する時間は、3~5分程度であった。図9に計測の一例を示す。卵子の透明体は、時間経過とともに変化し、6 hにおいては、解凍後より硬くなる傾向がみられた。

本研究では、ピペット型ロボチップを用いてマウス卵子の機械的特徴量のタイムラプス計測に成功した。今後は、機械的特徴量のタイムラプスデータと生物学的特徴量の関係を詳細に調査する予定である。構築したシステムにより、卵子の質に変化を時系列的に計測することができ、マウスを用いる生物学研究や不妊治療等、様々な分野に貢献することができるかと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

[1] 中原康, 佐久間臣耶, 新井史人, “ピペット型マイクロ流体チップを用いた卵子の機械的特徴量計測”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第32回研究会, 福岡, 2015年11月26日, 27日

[2] 中原康, 佐久間臣耶, 新井史人, “卵子の機械的特徴量計測のためのクレドルチップ”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第33回研究会, 東京, 2016年4月25日, 26日.

[3] 中原康, 佐久間臣耶, 新井史人, “オンチップ機械的特徴量計測のための卵子透明体の弾性球殻モデリング”, 化学とマイクロ・ナノシステム学会第34回研究会, 千葉, 2016年9月6日, 7日.

[4] K. Nakahara, S. Sakuma, F. Arai, “Time-lapse mechanical characterization of a single oocyte, The 20th international conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences, Dublin, Ireland, October 9-13, 2016.

[5] K. Nakahara, S. Sakuma, F. Arai, “On-chip cell mechanical characterization using non-tube measurement system, The 2016 international symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science, Nagoya, Japan, November 28-30, 2016.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

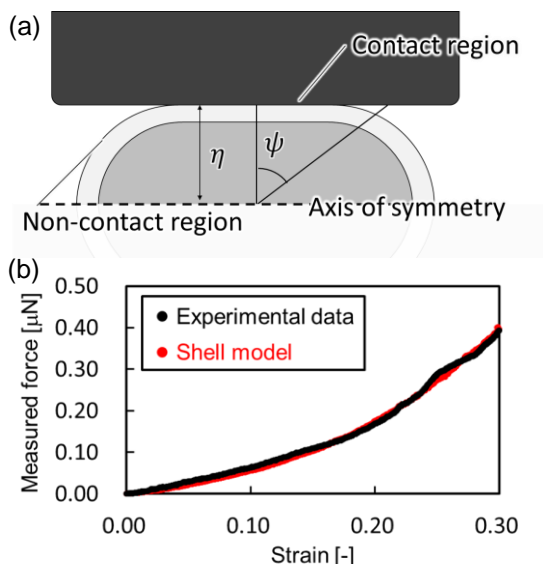


図7 機械的特徴量の指標化(球殻モデル). (a)球殻モデル, および, (b)モデルを用いた透明体のヤング率計測.

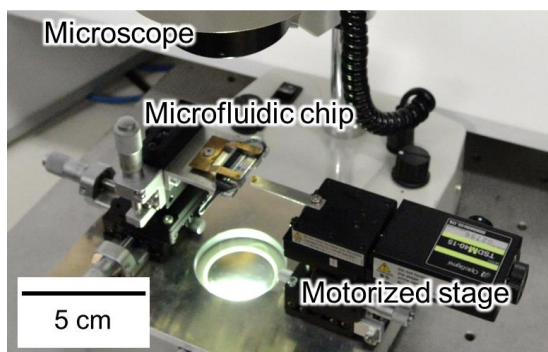


図8 構築した計測システム.

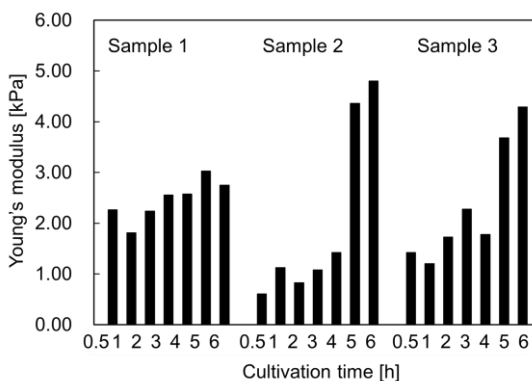


図9 機械的特徴量のタイムラプス計測.

〔その他〕

特になし.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐久間臣耶 (Sakuma, Shinya)
名古屋大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号: 40724464

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし