

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K14197

研究課題名(和文) マイクロ流路内細胞のPush/Pull非等価性

研究課題名(英文) Push / Pull non-equivalence of cells in the microchannel

研究代表者

金子 真 (Kaneko, Makoto)

大阪大学・工学研究科 教授

研究者番号：70224607

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：狭窄部を含むマイクロ流路を内蔵したマイクロチップ、圧力センサ、アクチュエータ組み込み型シリンジポンプ、実時間高速ビジョン等を組み込んだシステムを構築した。この実験システムを用いて狭窄部入り口部に細胞を接触させた状態からPush/Pullの実験を行い、細胞が狭窄部に進入する際の変形の様子について実験的に調べた。実験では液体塩分濃度を0.6%、0.7%、0.8%と変え、塩分濃度の影響についても考慮した。実験を行った結果、一般的な傾向として狭窄部に局所的に入り込んだ細胞の長さは、PushよりPullの方が長くなった。さらにその長さは塩分濃度が低くなるほど、短くなるという興味深い結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：We constructed an experimental system where it is composed of a microfluidic chip including a narrow channel whose diameter is even smaller than a cell to be tested, an actuator for changing a pressure either at the entrance or at the exist of narrow channel, a pressure sensor for measuring the pressure in the channel, a high speed vision for observing the cell to be tested, and a micro scope for enlarging the cell. A pressure servo system was also designed for changing the pressure in the channel. In order to observe the effect coming from osmotic pressure, we changed the NaCl density of liquid with 0.6%, 0.7%, and 0.8%, respectively, so that we may examine the effect of NaCl density. Experimental results showed that the cell nose which is the length of cell entering into the narrow channel is generally longer under pulling than under pushing. Also, it is shorter under low NaCl density than under high NaCl density.

研究分野：メカトロニクス

キーワード：MEMS 細胞操作 細胞計測

1. 研究開始当初の背景

(1) アスペクト比の大きい弾性棒の両端に力を加える場合，“引張”と“圧縮”で弾性棒の振る舞いが大きく異なる．特に弾性棒両端から圧縮力を徐々に大きくしていくとやがて弾性棒はその形状を維持できなくなり，図1の右側写真にあるように弾性棒の形状が一気に激変する．これがいわゆる圧縮内力によってもたらされる“座屈”である．この現象は材料力学の分野ではよく知られている．

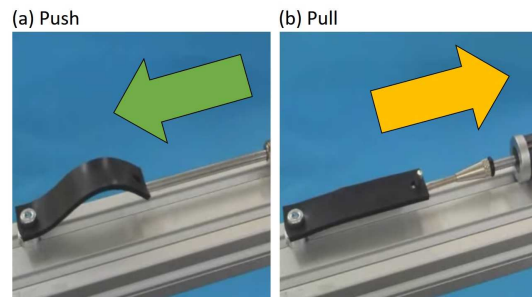


図1 座屈のデモ写真

(2) 運動会のはしごぐり競争を想定してみよう．この場合，小太りのヒトは後ろから押されるよりも前から引っ張られる方がはるかに簡単にはしごをくぐる抜けることができる．これと同じことは細胞が狭窄部を通過する際にも考えられる．例えば，図2のように極細マイクロ流路の入り口に細胞が接触している状態を想定してみよう．この状態で極細マイクロ流路の左側の圧力を上げた場合と極細マイクロ流路の右側の圧力を下げた場合で細胞の振る舞いは同じになるのだろうか．もし違が出るとするとどの程度なのだろうか．当該申請者が抱いた素朴な疑問である．マイクロ流路を通過する際，座屈とまではいかないにせよ，“Push”と“Pull”で細胞の振る舞いが異なることが予想される．このことは厳密な細胞変形能評価を行うという意味において当該分野に与える影響はきわめて大きい．以上が Push/Pull 時の細胞挙動に興味を抱いた背景である．

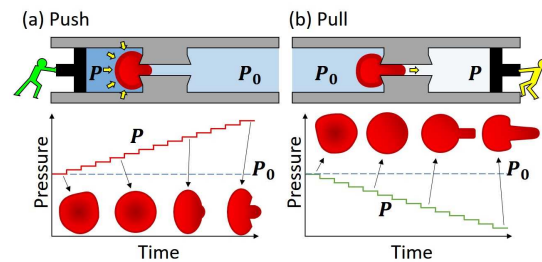


図2 Push/Pull の細胞変形特性の予想

ラ，マイクロチップ内細胞の大きさを拡大するための顕微鏡，さらに細胞の制御及びデータ管理を行うためのコンピュータにより構成される．図3上部に圧力制御系が示されている．このシステムにより，狭窄部入り口部，出口部における圧力を自由に変えることができる．

2. 研究の目的

(1) 狭窄部を含むマイクロ流路を内蔵したマイクロチップ，圧力センサ，アクチュエータ組み込み型シリンジポンプ，実時間高速ビジョン，顕微鏡を用いて圧力センサ出力に基づくセンサフィードバック内蔵型の実験システムを構築し，Push/Pull 時における細胞の振る舞いにどのような違いがあるかについて明らかにする．

(2) もし Push/Pull 時に違いが確認される場合には，塩分濃度を 0.6%，0.7%，0.8%と変えて，意図的に細胞内部の浸透圧を変化させた場合，細胞の振る舞いがどのような影響が現れるのかについても実験的に明らかにする．

3. 研究の方法

(1) 実験システム：図3は本研究で使用した実験システムである．実験システムは大きく狭窄部を含むマイクロ流路を組み込んだマイクロチップ，マイクロ流路内の圧力をモニタする高精度圧力センサ，ピエゾアクチュエータを組み込んだ高精度高ストロークシリンジポンプ，細胞の位置と形状を実時間でモニタするための実時間高速カメ

(2) 細胞制御法：Push, Pull 時の細胞形状の違いを観察するためには，細胞を狭窄部入り口部に接触力なしの初期状態から上流側の圧力を ΔP 上げる，または下流側の圧力を ΔP 下げるという条件下で実験を行う．この理想条件に少しでも近づけるために，圧力制御系をいかに理想に近づけられるかが，Push/Pull 時の細胞変形形状の違いを観察する実験のポイントとなる．この意味でネックになるのが，圧力センサに介在するノイズである．圧力センサから出るノイズが Push 側あるいは Pull 側の ΔP の変化と等価になってしまうと実験結果の信頼性が失われてしまう．そこで，圧力センサに介在するノイズを除去するローパスフィルターを制御系に組み込む．これにより制御系のダイナミック特性は失われてしまうが，本研究はダイナミック特性を見ようとしている訳ではないので，ローパスフィルターの組み込みが Push/Pull 時の細胞変形特性に大きな影響を及ぼすことはないものと考えている．

(3) 圧力応答特性：単一目標圧力に対する変形形状に着目してしまうと，偶発的に発生する圧力変動等による変形が起こる可能性がある．このような偶発性を排除するため，図3の圧力制御系を用いて目標圧力を最小分解能で時間に対して階段関数的に増加させ，そのときの狭窄部内の細胞変形の

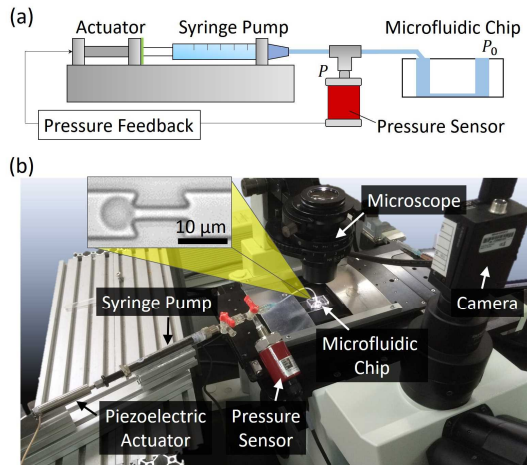


図 3 実験装置 (a) 圧力制御系, (b) 実験システム外観.

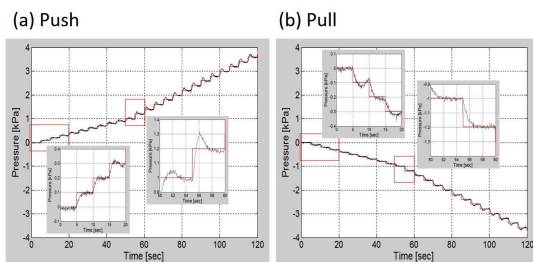


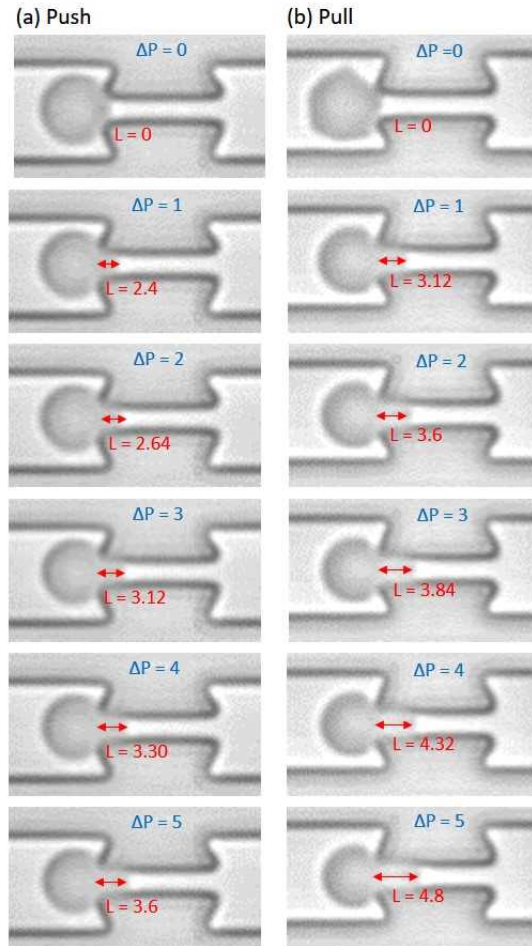
図 4 圧力応答特性

様子を観察する. 図 4 は圧力応答特性の一例を示したものである. 階段状の目標値変化に対して実際の圧力値が Push, Pull いずれの場合もうまく追従しているのが見てとれる.

(4) 浸透圧調整: 細胞の変形能は培養液中の塩分濃度や pH によって大きく左右される. 例えば赤血球は血漿の塩分濃度が下がると浸透圧の関係で液体が赤血球内部に入り, 結果的に形状が膨らみ, しかも硬くなることが知られている. Push, Pull 時の変形の違いを顕著にだすため, 生理食塩水の塩分濃度をあえて 0.8%, 0.7%, 0.6% と低下させた状態での実験も行う. これにより, Push, Pull 時の現象に塩分濃度がどの程度関与しているのかについても知ることができる.

4. 研究成果

(1) 図 5 は Push, Pull 時における各圧力印加時における細胞の振る舞いの様子である. ここで ΔP の数値の単位は kPa である. さらに L は, 狭窄部の細胞長さを表し, 単位は μm である. 図 5 左は Push に対応し, 右は Pull に対応している. 例えば, $\Delta P=5$ というのは左図の場合には左側を 5 kPa 増圧したことを意味し, 右図の場合は右側を 5 kPa 減圧したことを意味している. この実験結果からわかることは, 同一圧力に対してみると, Push よりも Pull の方が, 狭窄部内の細胞長さに関



(Pressure in [kPa]; Insertion Length L in [μm])

図 5 実験結果 (Push, Pull 時の細胞形状の圧力に対する変化の様子)

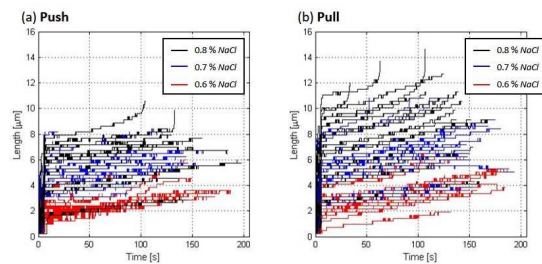


図 6 狭窄部内細胞先端長さの Push, Pull 時印加圧力との関係

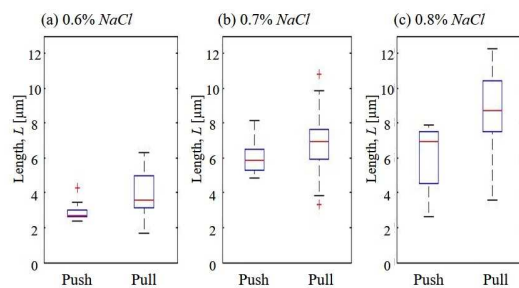


図 7 NaCl 濃度と Push, Pull 時の細胞先端長さの統計データ

しては、Push よりも Pull の方が長い。これは直観とも一致する。

(2) 図6は狭窄部内に入っている細胞長 L が圧力に応じてどのように変化するかについて NaCl 濃度をパラメータとして調べた図である。ここで、赤色、青色、黒色のデータはそれぞれ NaCl 濃度が 0.6%、0.7%、0.8% の場合に対応している。図5より、全体的に NaCl 濃度が高いほど、 L は長くなっている様子がみとれる。一般に、NaCl 濃度が高いほど浸透圧は下がるため、細胞は柔らかくなり、結果的に L が長くなっているものと思われる。この点も直観と符合する。さらに Push と Pull という視点で比較すると、Push より Pull の方が L は長くなっているのが見てとれる。このようにサンプル数を増やしても図5の結果は維持されている点に留意されたい。図7は、図6を別の視点で表示したものである。図7からも同様な結果が見てとれる。

(3) 以上の実験結果は、細胞変形能評価を行う場合、Push/Pull に応じて結果が変わることを意味し、細胞変形能評価を行う場合の実験条件に十分留意する必要があることを示唆している。さらに細胞変形能評価では NaCl 濃度にも留意する必要があることを付記しておきたい。

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 4 件)

- ① K. Mizoue, M. H. Phan, C. D. Tsai, M. Kaneko, J. Kang and W. K. Chung, Gravity-Based Precise Cell Manipulation System Enhanced by In-Phase Mechanism, *Micromachines*, 査読有, vol.7, 2016, 116.
DOI: 10.3390/mi7070116
- ② C. D. Tsai, J. Tanaka, M. Kaneko, M. Horade, H. Ito, T. Taniguchi, T. Ohtani and Y. Sakata, An On-Chip RBC Deformability Checker Significantly Improves Velocity-Deformation Correlation, *Micromachines*, 査読有, vol.7, 2016, 176.
DOI: 10.3390/mi7100176
- ③ K. Mizoue, K. Teramura, C. D. Tsai and M. Kaneko, Transfer Function of Macro-Micro Manipulation on a PDMS Microfluidic Chip, *Micromachines*, 査読有, vol.8, 2017, 80.
DOI: 10.3390/mi8030080
- ④ M. Horade, C. D. Tsai, H. Ito and M. Kaneko, Red Blood Cell Responses during a Long-Standing Load in a Microfluidic Constriction,

Micromachines, 査読有, vol.8, 2017, 100.

DOI: 10.3390/mi8040100

[学会発表] (計 6 件)

- ① C. D. Tsai, M. H. Phan, K. Mizoue and M. Kaneko, Unexpected Beads Alignment in a Microfluidic Channel, *IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS2016)*, Daejeon, Korea, 2015.10, pp5143-5148.
- ② M. Horade, C. D. Tsai, H. Ito, M. Tanaka and M. Kaneko, "Chameleon Effect" of Rbc under Loading in Micro-Fluidic Channel, *the 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS16)*, Dublin, Ireland, 2016.10, pp311-312.
- ③ C. D. Tsai and M. Kaneko, Cell Sweeper for Microfluidic Cavity, *the 20th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS16)*, Dublin, Ireland, 2016.10, pp1537-1538.
- ④ C. D. Tsai, M. H. Phan and M. Kaneko, Buckling of RBC Under Positive and Negative Driving Pressure in a Microchannel, *The 27th International Symposium on Micro-Nano Mechatronics and Human Science (MHS2016)*, Nagoya, Japan, 2016.11, pp122.
- ⑤ R. Murakami, A. Yamamoto, H. Ito, C. D. Tsai, M. Horade, M. Tanaka and M. Kaneko: Observation of Cell Pinball Through High Speed Switching Between Reflection Interference and Phase Contrast, *The 30th IEEE Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017)*, Las Vegas, USA, 2017.01, pp1337-1338.
- ⑥ M. Horade, M. Kaneko, C. D. Tsai, H. Ito, N. Higashino, T. Akai, U. Yokoyama, Y. Ishikawa, S. Sakuma and F. Arai: On-Chip Cell Gym, *The 30th IEEE Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS2017)*, Las Vegas, USA, 2017.01, pp603-604.

[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]

<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