

令和元年6月20日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K14625

研究課題名(和文) マイクロ流路内の赤血球挙動 “カメレオン・エフェクト”

研究課題名(英文) Red Blood Cells Behavior "Chameleon Effect"

研究代表者

洞出 光洋 (Mitsuhiro, Horade)

大阪大学・工学研究科 ・助教

研究者番号：30583116

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：毛細血管を模擬したマイクロ流路内で赤血球を拘束し、さらに拘束させる負荷時間を増加させたところ、赤血球の色が劇的に変化する現象を発見した。この現象を“カメレオン・エフェクト”と名付け、ビジョンによる可視化法を基に、赤血球挙動(色・形状)を高精度に時空間解析するアプローチで、色変化がなぜ起こるか解明を試みた。結果的に、色変化が起こる領域、時間帯を調査すると、物理的負荷が原因である可能性が示唆された。赤血球の挙動変化解析において、色を指標にした研究報告例はこれまでなかったが、今回の研究成果から、色変化を指標とした診断応用に繋がる期待が持てる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

拘束中の赤血球は色変化と合わせて形状変化も起こしていることが確認できた。赤血球変形性能は循環器系疾患と密接な関係があるため、色変化を評価指標にした医療応用への可能性が期待できる。特に顕微鏡下で挙動をその場で確認できるため、診断応用においても早期発見等に繋がる可能性もあり、これまで実施例のなかった色を指標にした学術的研究を実施できたことは、診断応用や診断装置開発において新たな知見となった。

研究成果の概要(英文)：When constraining red blood cells in a microchannel simulating a blood capillary and loading time was increased, there was a phenomenon in which the color of red blood cells changed dramatically. This phenomenon was named "chameleon effect", and tried to clarify why color change occurs by spatio-temporal analysis of red blood cell behavior (color and shape) with high precision based on visualization method by vision. As a result, it was suggested that physical load might be the cause when investigating the area where color change occurs and the time region. There have been no research reports using color as an indicator for analyzing behavior change of red blood cells, but from this research result, it can be expected to lead to diagnostic application using color change as an indicator.

研究分野：知能機械学・機械システム

キーワード：細胞操作 細胞特性計測 ナノ・マイクロシステム 知能機械学 画像解析

1. 研究開始当初の背景

申請者はナノ・マイクロデバイスの設計・開発が専門であり、細胞操作用ナノ・マイクロロボット開発、マイクロ流路を用いたアッセイデバイス開発、それらのデバイスを用いた細胞評価試験を実施してきた。細胞評価試験の一環で、毛細血管と同じスケールの流路を有するマイクロチップを開発し、模擬毛細血管内で赤血球を拘束させる負荷試験を実施した。この試験を遂行していく過程で、赤血球を変形させる拘束負荷時間を増加させたところ、赤血球の色が劇的に変化する(図1)現象を発見した。この現象を、赤血球の“カメレオン・エフェクト”と名付け、当該申請は、赤血球の拘束中において、なぜ負荷時間の増加とともに色が変化するのか、この疑問を解き明かしたいという動機付けが出発点になっている。赤血球変形性能は循環器系疾患との密接な関係があり、色変化と変形性能の相関を定量的に明示することで、赤血球の性質や病気との相関提示に繋がる可能性がある。そこで、色変化と変形性能との相関を定量的に導出し、色変化を評価指標にした医療応用への足掛かりをつかみたいと考えた。

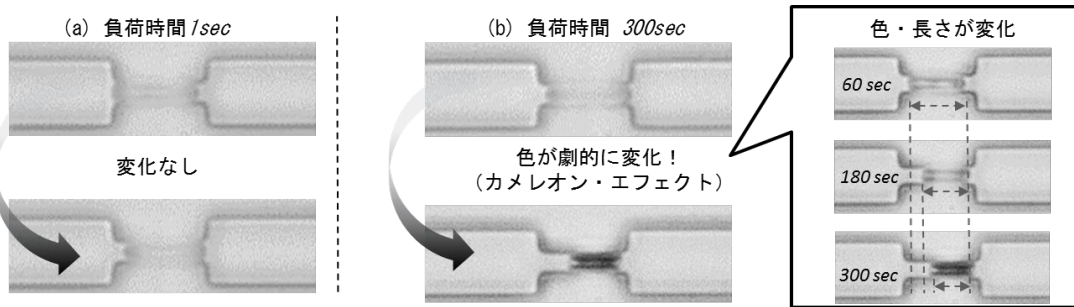


図1 カメレオン・エフェクト。マイクロ流路内で、赤血球の色が劇的に変化する現象を発見

2. 研究の目的

毛細血管を模擬したマイクロ流路内で赤血球を拘束し、さらに拘束させる負荷時間を増加させたところ、赤血球の色が劇的に変化する現象を発見した。当該申請では、ビジョンによる可視化法を基に、赤血球挙動(色・形状)を高精度に時空間解析するアプローチで、色変化が誘発するメカニズムを解明することを目的とする。

また、拘束中の赤血球は形状変化も起こしており、ビジョン情報から色変化と変形性能との相関を明らかにする。赤血球変形性能は循環器系疾患と密接な関係があるため、色変化を評価指標にした医療応用への可能性を提示する。赤血球変形性能は、心筋梗塞や脳梗塞等の循環器系疾患と密接な関係があるため、色変化と変形性能の相関を定量的に明示することで、赤血球の性質や病気との相関提示に繋がる可能性がある。本研究では、色変化指標を利用した新しい診断方法や医療応用に展開するための基盤となる研究を行う。

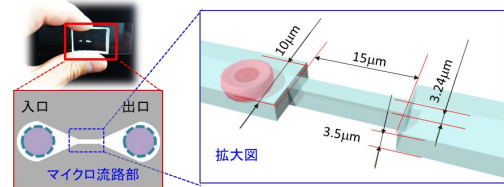


図2 マイクロ流路チップ

3. 研究の方法

赤血球を拘束するためのマイクロ流路チップが必要となる。実際に製作したマイクロ流路チップを図2に示す。実際の毛細血管は円形であり、その直径は文献にもよるが、4 - 6マイクロメートルである。今回は横幅3.24マイクロメートル、高さ3.50マイクロメートルの長方形断面を有する人口毛細血管をデザインした。半導体プロセスにより、シリコン基板上にSU-8レジストにより型を製作し、その後生体適合性と透明性に優れたシリコン樹脂の一種ポリジメチルシロキサン(PDMS)樹脂製の流路を成型加工により製作した。さらにPDMS製マイクロ流路とガラスを接着させて、マイクロ流路チップを製作した。

次に、このマイクロ流路内で赤血球を拘束するための実験システムを構築し、その外観図と

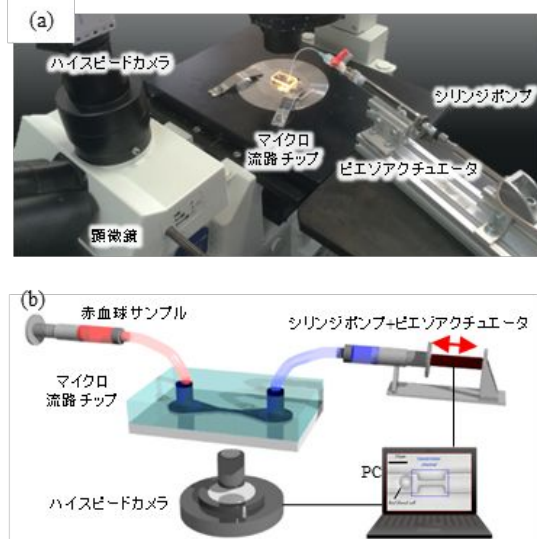


図3 実験システム(a)外観(b)概要図

概要図を図3に示す。実験システムは、顕微鏡、マイクロ流路チップ、赤血球サンプル、シリンジポンプ、ピエゾアクチュエータ、ハイスピードカメラ、PCから構成されている。マイクロ流とチップの入口側に赤血球サンプルを、もう一方の出口側にシリンジポンプを接続する。シリンジポンプはピエゾアクチュエータで駆動することができ、この2つが人間の心臓の役割を果たすことができる。ただし、ピエゾアクチュエータはパワフルであり、通常の人間の心臓レベルでは不可能なスペックを備えている。また、ピエゾアクチュエータとハイスピードカメラの両方をPCと接続し、赤血球の位置情報をハイスピードカメラで取得し、目標位置で赤血球を高精度に位置決めするために、フィードバック制御によりピエゾアクチュエータを駆動して赤血球をマイクロ流路の狭窄部で拘束する。また、赤血球の形状情報をハイスピードカメラで同時に記録、PCに保存することで、画像ベースの挙動解析を実施することが可能である。

赤血球サンプルは生理食塩水で濃度調整し、マイクロ流路チップ内に導入する。

4. 研究成果

マイクロ流路内で拘束した赤血球の画像情報を取得し、拘束時間に対する赤血球の形状ならびに色変化を解析した。図4は赤血球領域を切り出し、初期状態のグレイ値を0と規格化した上で、1ピクセル当たりのグレイ値の変化量を示した。赤は赤血球領域、青はリファレンスとなる赤血球が存在しない領域のグレイ値変化を示している。図5は長さの変化量を示しており、初期状態の赤血球を1として規格化した。赤血球全体で見た場合、グレイ値が上昇しながら長さが減少していることが確認できる。

さらに赤血球の局所に着目して解析を実施した。図6は赤血球領域の中心領域、両端領域での解析結果である。中心付近（赤線）が両端に比べて大きく色変化が起きていることが確認できた。また両端において

は、一方（青線）は拘束時間の増加とともにグレイ値が上昇しているのに対し、もう片方（緑色）は拘束時間の増加に関係なく、変化量が極めて少ないことが確認できた。特に後者の変化量が極めて少ない端部は、赤血球を流路内で拘束するために設置したアクチュエータとの接続側でもある。今回の解析結果から、拘束中の赤血球の領域において、色変化が起こる個所と、比較的起こらない箇所が存在することが判明した。またビジュアルフィードバックによる位置制御も後者の色変化量が極めて少なかった端部で実施している。

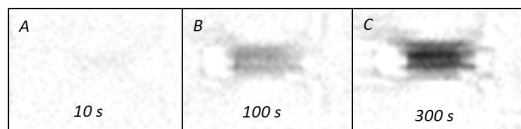
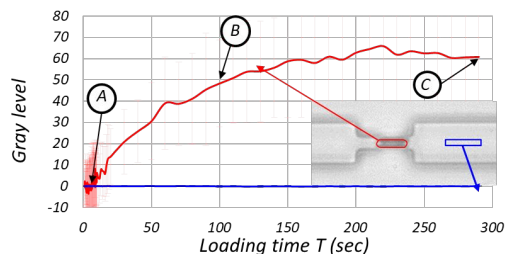


図4 赤血球領域全体のグレイ値変化

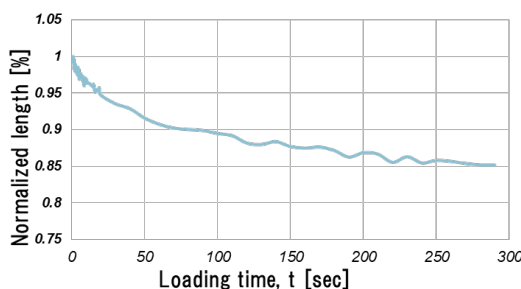


図5 赤血球の長さ変化

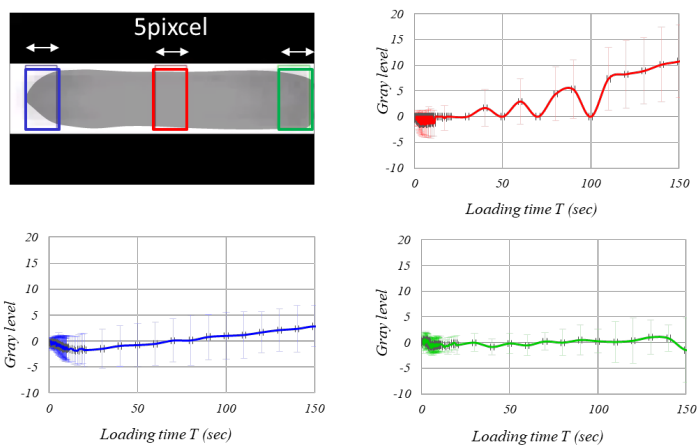


図6 領域ごとのグレイ値変化(1)

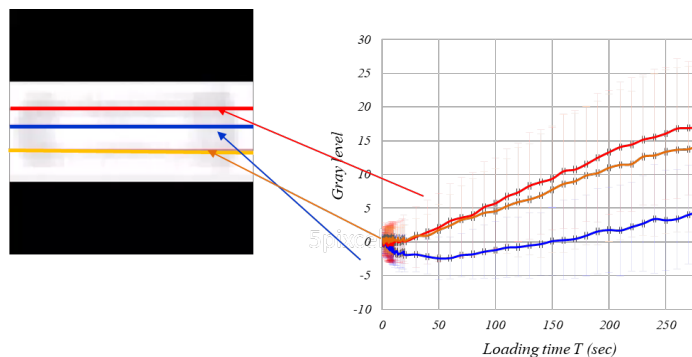


図7 領域ごとのグレイ値変化(2)

図7は流路壁に対して平行な線ごとでグレイ値の変化を解析した結果である。図より、流路壁に近い領域ほど色変化が大きく起きており、流路壁から最も遠い中心線付近で色変化が起きていないことも合わせて確認できた。流路壁との摩擦が起こる箇所ほど色変化が起っており、壁側からの物理的負荷が色変化に影響しているのではないかと考察した。

図6および図7は複数サンプルの平均である。図9はそのなかでも1つのサンプルに着目して時間変化ごとにどの領域のグレイ値が変化しているかを示した図である。3次元マップのZ軸のマイナス方向がグレイ値の変化であり、大きく変化する箇所と、変化しない箇所を確認することができた。特に流路壁と直接接触する領域が色変化量の大きい箇所である。このことから物理的負荷による作用が赤血球に対して影響を与えたと考えられる。赤血球以外の細胞に対しても、物理的負荷とその負荷に対する反応が起こっていたため、色変化現象が物理的負荷に大きく依存していることが示唆された。物理的負荷により、赤血球細胞が変形しながら色を変化しているが、赤血球の変形性能は疾病との相関が強い。今後変形性を失った赤血球等で同じ実験を行うことで、大きく色が変化する時間帯や色変化量が、今回提示した結果と異なることは大いに予測できる。今回は色変化を指標とする、これまでにない研究を遂行することができたが、医療応用へ繋げるための貴重なデータベースとなる結果を得ることができた。

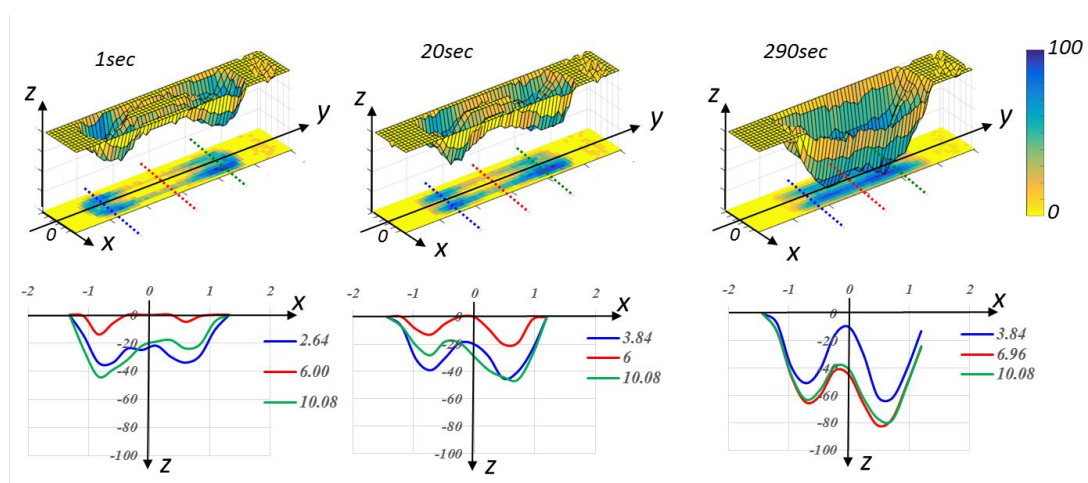


図8 領域ごとのグレイ値変化(3)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Horade Mitsuhiro, Tsai Chia-Hung, Kaneko Makoto, On-Chip Cell Incubator for Simultaneous Observation of Culture with and without Periodic Hydrostatic Pressure, 査読有, Micromachines, 10 (2), 2019, 133-139. DOI:10.3390/mi10020133

〔学会発表〕(計5件)

1. Mitsuhiro Horade, Development of micromanipulator with semiconductor strain gauge that can be used in solution, Micro Alliance, 2018.
2. 洞出光洋, 細胞硬さ計測のための半導体ひずみゲージの開発, 微細加工とその応用シンポジウム, 2018.
3. 洞出光洋, 微細加工技術を用いたライフサイエンス分野への応用研究, 第4回バイオナノミクス基盤技術研究会, 2018.
4. 洞出光洋, 伊藤弘明, 蔡佳宏, 高山俊男, 金子真, On-chip Cell Gym の設計と動作確認実験, ロボティクス・メカトロニクス講演会, 2017.
5. 洞出光洋, 蔡佳宏, 伊藤弘明, 金子真, 赤血球“カメレオン効果”, 第34回「センサ・マイクロマシンと応用システム」, 2017.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。