

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2009

課題番号：19360188

研究課題名（和文）

生きたままの細胞への局所投薬のためのジャグリングプローブ技術

研究課題名（英文）

Juggling-probe for local dosing to living cells

研究代表者

石丸 伊知郎 (ISHIMARU ICHIROU)

香川大学・工学部・教授・

研究者番号：70325322

研究成果の概要（和文）：

細胞を用いた薬剤効果評価法として、触診による細胞粘弾性力分離計測技術を確立した。本手法は、光圧力を用いてマイクロプローブを振動操作し、細胞に対して触診する。本手法では、微弱な光圧力をバネ力として用い、表面効果である粘性抵抗が支配的に働く。これらの2つの作用により粘性力を顕在化することで、細胞の粘性力と弾性力の分離計測が可能である。細胞触診による粘弾性力分離計測モデルを構築し、より高精度な計測を行うための粒子直径計測手法を確立した。

研究成果の概要（英文）：

We research the separation measurement technology of viscous force and elastic force for evaluate the effects of medicine to single living cells. This method palpates the cell surface with vibrated micro-sphere by light pressure. Because this method used light pressure which is low as elastic force and the surface effect is the dominant factor of dynamics of micro objects, rather than the volume effect, we think that viscous force which is very little force is obtained, and separation viscous force and elastic force. We constructed the model of separative cell-palpation method, and the measurement of the particle diameter to secure the high accuracy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：医用計測工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・計測工学

キーワード：計測システム, 光圧力, 細胞, 投薬, 多自由度

1. 研究開始当初の背景

細胞を用いた薬剤効果評価法として、触診による細胞粘弾性力分離計測技術の確立を目指している。本手法は、光圧力を用いてマイクロプローブを振動操作し、細胞に対して触診する。従来のカンチレバーを用いた手法では、バネ力である弾性力が極めて大きく、微弱な粘性力を計測することが困難である。しかし本手法では、微弱な光圧力をバネ力として用いることでバネ定数を2桁ほど小さくすることが出来る。さらに、マイクロプローブは、表面効果である粘性抵抗が支配的に働くことが知られており、これらの2つの作用により粘性力を顕在化することで、細胞の粘性力と弾性力の分離計測が可能である。

2. 研究の目的

細胞を用いた薬剤効果評価法として、触診による細胞粘弾性力分離計測技術の確立を目指している。

近年、細胞の硬さ変化から薬剤効果の検証が行われている。硬さ計測には、原子間力顕微鏡 AFM (Atomic Force Microscope) のカンチレバーを用いた触診による粘弾性力計測手法が用いられる。しかし、粘性力に対する感度が低く、粘性力と弾性力の分離計測が困難であり、多方向からの計測が難しいことや、約 $10 \mu\text{m}$ の細胞への位置決め操作も課題である。

そこで、光圧力を用いてマイクロプローブを振動操作し、細胞触診する細胞粘弾性力分離計測技術を提案する。カンチレバーでは、バネ力である弾性力が極めて大きく、微弱な粘性力の計測することができない。しかし本手法では、微弱な光圧力をバネ力として用いることでバネ定数を2桁ほど小さくなる。さらに、マイクロプローブは極めて小さく、表面効果である粘性抵抗が支配的に働くことが知られており、これらの作用により粘性力を顕在化することで、細胞の粘性力と弾性力の分離計測が可能であると考えられる。

まず、プローブと溶液、プローブと細胞間の流体特性を考慮したバネ質量ダッシュポットモデルを構築し、解析的に細胞の粘性力と弾性力の分離計測が可能であることを示す。ここで、細胞の硬さを計測する為には、プローブと溶液の相互作用、特に粘性係数を事前に明確にする必要がある。そこで次に、構築した力学モデルに基づいた粘性係数計測技術を提案し、プローブと溶液の相互作用である粘性係数を計測した結果について示す。また、粘性計測技術は、他分野においても応用展開可能である。現在は MEMS (Micro

Electro Mechanical System) 分野における μ -TAS (Total Analysis Systems) の設計指標や構造粘性などの流体特性計測への適用も検討している。

3. 研究の方法

細胞とプローブ、培養液とプローブの2つの相互作用を考慮した細胞触診のためのバネ質量ダッシュポットモデルを構築した。図1に細胞触診技術のイメージ図を示す。図2に細胞触診モデルを示す。ここで、光圧力による求心力を強制変位として与えたバネとし、培養液による粘性抵抗をダッシュポットとした。さらに細胞パラメータでは、細胞骨格に起因する弾性力をバネとして、細胞内液や細胞膜近傍の成分による粘性抵抗をダッシュポットとして置いた。これまでに、触診モデル上部のプローブと溶液の相互作用部について検証し、粘性係数計測手法として報告してきた。そして、式(B)よりプローブと溶液の相互作用である粘性係数を計測可能であることを示してきた。ここで、 μ は溶液の粘性係数、 k は光圧力による求心力、 a は励起振幅、 X は振動振幅、 D は粒子径、 ω は角振動数である。そして、溶液による粘性項 c は、細胞触診時に必要となるパラメータであり、式(A)により表される。

$$c = \frac{ka}{X\omega} = 3\pi\mu D \quad \dots (A)$$

$$\mu = \frac{ka}{3\pi X D \omega} \quad \dots (B)$$

次に、細胞に対して触診した際のプローブの運動方程式を式(1)に示す。ここで、プローブとして微小粒子を用いた。これにより、細胞によるバネ定数 k_2 と粘性項 c_2 を以下の式(2)、(3)として表すことが出来る。

$$m\ddot{x}_2 + (c_2 + c)\dot{x}_2 + k_2(x_2 + X_2) + k(x_2 - a \cos \omega t) = 0 \quad \dots (1)$$

ここで、 x_2 は粒子振幅、 X_2 は細胞の応答振幅、 k_2 は細胞の弾性係数、 c_2 は細胞の粘性係数である。さらに、 c は培養液により粒子に作用する粘性項である。この式(1)より細胞のバネ係数 k_2 と粘性係数 c_2 は、計測された細胞の応答振幅 X_2 、応答周波数 Ω 、事前に計測したプローブと培養液の相互作用から式(2)、(3)にそれぞれ分離することが出来る。

$$k_2 = m\Omega^2 - k \quad \dots (2)$$

$$c_2 = \frac{ka}{X_2\omega} - c \quad \dots (3)$$

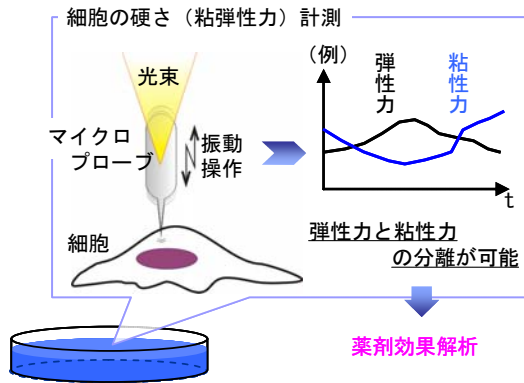


図1 細胞触診による薬剤効果解析のイメージ図

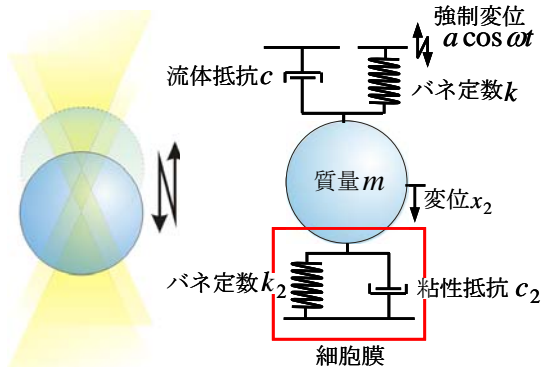


図2 細胞触診における粒子振動イメージと力学モデル

4. 研究成果

4. 1 粘性係数計測実験と温度変化による影響

粒子振幅をより高精度に計測する為に、光源に Ar レーザを用いた反射型暗視野光学系とし、粒子のレンズ効果により生じる輝点像を観察する。これにより、図3に示すように粒子を輝点像として可視化できる。さらに、数値計算により輝度重心位置を導くことで、より高精度な計測を可能とした。

図4 上部に粘性係数計測実験を行った結果を示す。試料には、質量パーセント濃度を0%から50%まで5%ずつ変化させたグリセリン水溶液を用いた。そして、粒子には、直径 $10\mu\text{m}$ のホウ珪酸ガラス球を用いた。ここで、横軸は質量パーセント濃度、縦軸は粘性係数である。計測結果から、大きなばらつきが確認出来る。ここで、一般的に粘性係数は、温度の影響を強く受けるパラメータである

ことから、これらのばらつきを温度の幅に換算すると、約 5°C から 25°C の範囲に含まれていることとなる。

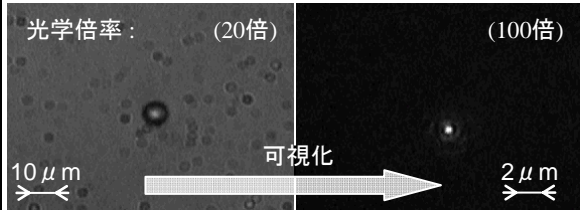


図3 粒子の明視野観察像と計測用暗視野観察像

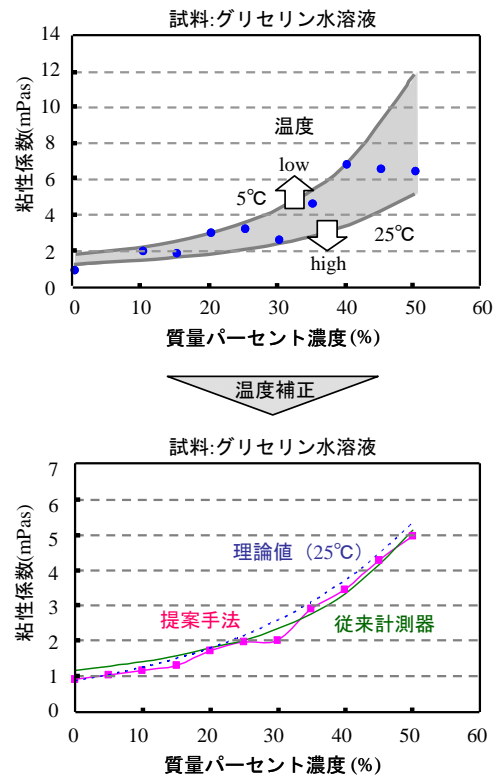


図4 温度影響除去による粘性係数計測精度の向上

そこで、これらばらつきの要因を温度であると仮定し、恒温装置を用いて温度制御を行うことにした。使用する恒温装置の温度制御精度は $\pm 0.1^\circ\text{C}$ である。温度制御を行い、再度粘性係数計測を行った結果を図4下部に示す。本グラフにおいて、提案手法による計測値をデータ点付実線で示す。そして、 25°C における理論値を点線、従来計測装置による計測値を実線で示す。これより、提案手法による計測精度が理論値に対して10%以下で計測できた。これは、従来手法と同等の計測精度である。

4. 2 レンズ効果の非線形利用した粒子径計測原理

現在、我々は粒子径計測手法として図5に示すような2種類の方式を考えている。1つは反射型方式であり、もう一つは透過型の方式である。それぞれについて説明する。

(1) 反射型計測方式

図5に示す反射型計測手法について述べる。本方式は、粒子径を高精度に計測することができ、さらに細胞触診と同時計測が可能である。しかし、カバーガラスからの反射光に比べ、粒子からの反射光量が微弱なため粒子のみを観察することが困難であり、ハイスピード、かつ高感度な受光器が必要となる。試料面に低N.A.で集光することで、光束の焦点深度内で粒子を照明する。この時、粒子表面からの反射光は、粒子の曲率に応じた方向 θ に生じ、対物レンズの後側焦点面であるフーリエ変換面上に光強度分布を形成する。この光強度分布は、粒子の振動に伴って非線形に変化し、PSD (Position Sensing Diode)を用いて輝度重心を計測することで粒子径を算出出来る。特に、粒子の照明位置が中心より離れるほど大きく変化し、より高精度に粒子径を導くことが出来ると言える。

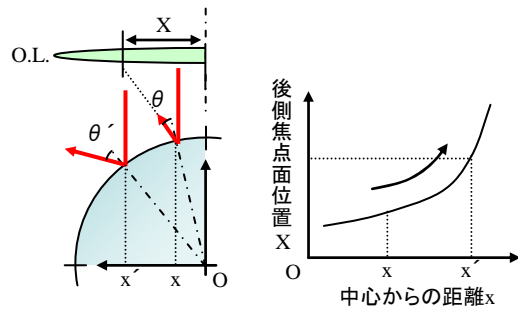


図5 レンズ効果の非線形利用した粒子径計測原理 (反射型計測法式)

(2) 透過型計測方式

透過型計測方式について述べる。図6に原理図を示す。本方式は、反射方式に比べて計測光量が大きいため、一般的な受光器での計測が可能である。しかし、粒子の変位に伴った計測光の変化量が小さく、振幅計測のためには計測精度、計測レンジが低い欠点がある。透過型も同様に粒子に対して集光照明し、PSDを用いて輝度重心を計測する。この時、粒子を透過した光束はレンズ効果により曲率に応じた位置に集光することとなる。そして、粒子の変位に伴って非線形に変化する集光位置を計測する。計測データを図6下部に示す。図中(a), (b), (c)が、粒子が照明されている領域となる。ここで、粒子径依存領域における粒子操作量と計測値から粒子径を算出する事出来る。しかし、図中(a), (c)に示すように、照明していない領域がある場合、輝度重心が光量の大きい方へ引きずられるために計測値として用いることが難しいと言える。

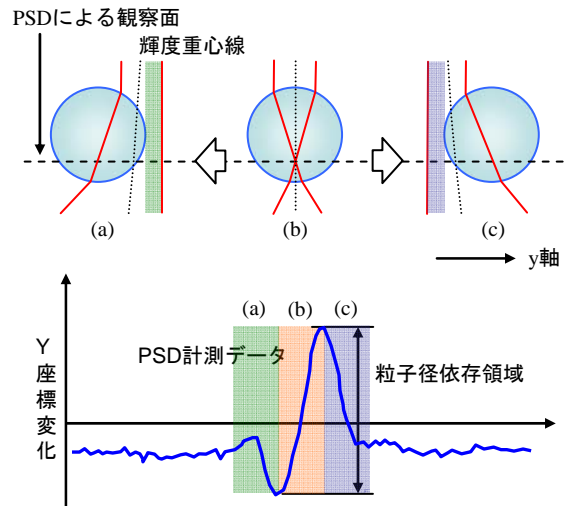


図6 レンズ効果の非線形利用した粒子径計測原理 (透過型計測法式)

4.3 細胞粘弾性力分離計測光学系の概要

本光学系は、プローブ振動操作のための光ピンセット光学系、振幅変化計測光学系、細胞観察のための位相差顕微鏡より構成している。プローブの振動操作は、光源にグリーンレーザー(メーカー: COHERENT 社, 型番: Verdi-V2, 波長: 532nm)を用い、ガルバノスキャナ(メーカー: TEM, 再現性: $8\mu\text{rad}$)により偏向させる。偏向した光束は、対物レンズ(メーカー: OLYMPUS, 型番: M Plan Apo 100x oil, N.A.: 1.4)に入射後、粒子に対して集光照明する。このとき合焦点内に点在する粒子は集光位置に引き寄せられ捕捉され、偏向に伴い変位する。そこで、最大操作周波数は2kHz、操作レンジは $-20\mu\text{m}\sim 20\mu\text{m}$ である。

振動計測光学系は、粒径サイズと振幅を計測する光学系であり、透過型計測手法を基に構築した。光源にヘリウムネオンレーザーを用い、プローブに対して集光照明する。この時、粒子にはヘリウムネオンレーザーによる求心力も作用することになる。ここで、レーザー光を減光することにより、粒子に作用するばね力を振動振幅値に影響の無い程度まで小さくしている。そして、レンズ効果により形成された集光位置の輝度重心をPSDにより計測することで振幅やプローブ径などの計測を可能とする。将来的には、反射型方式による計測を目指していく。

4.4 細胞触診実験

以上の要素技術を用いて、現在、細胞触診実験を進めている。図7に細胞触診の位相差顕微鏡画像を示す。ここで、プローブ球として直径 $5\mu\text{m}$ のホウ珪酸ガラス球を、試料には、付着細胞であるRASM細胞(ラット血管平滑筋細胞)を用いた。細胞に触診する前後で振動振幅変化が生じていることを目視で確認することが出来た。今後、提案する計測

手法により粒子径を計測し、細胞粘弾性を評価する予定である。

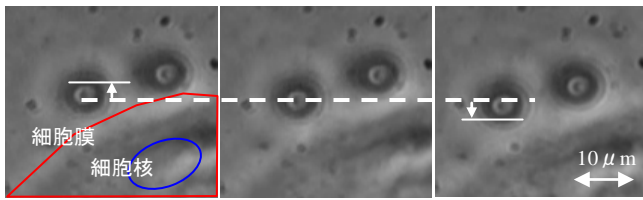


図7 細胞触診時の位相差顕微鏡画像

4. 5 まとめ

我々は、薬剤効果解析を目指した細胞粘弾性力分離計測技術の研究を行っている。ここで、プローブに作用するバネ力として微弱な光圧力を用いることで、従来のカンチレバーに比べ弾性係数が極めて小さく出来る。さらに、マイクロな領域では、体積効果である慣性力よりも表面効果である粘性力が支配的に働くことが知られている。これらの2つの作用により、微弱な細胞の粘性係数を顕在化することができ、弾性力との分離計測が可能となる。そこで、細胞触診による粘弾性力分離計測モデルについて述べ、より高精度な計測を行うための標準粒子の直径計測手法についても示した。現在、細胞触診実験を進めており、今後、提案手法により細胞粘弾性を評価し創薬への効果を検証する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

- ①石丸伊知郎, 単一細胞局所投薬マイクロプローブ技術, 光アライアンス, 日本工業出版, 査読無, 2巻, 59-62, 2008

〔学会発表〕(計9件)

- ①堤良介, 下所和弘, 西山成, 石丸伊知郎, 光圧力操作マイクロプローブによる細胞の粘弾性力分離計測 2010年度精密工学会春季学術講演会, 2010年3月16日, 埼玉大学
- ②浦木智央, 下所和弘, 合谷祥一, 末吉紀行, 石丸伊知郎, 光圧力駆動マイクロプローブによる粘弾性力計測技術, 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2008, 2008年11月4日, 筑波大学
- ③Tomohiro Uraki, Kazuhiro Gesho, Shoichi Gohtani, Noriyuki Sueyoshi, Ichirou Ishimaru, Separative-measurement of viscos and elastic force for living cells with floating-type micro probe, The 25th Sensor symposium, 2008年10月21日, 沖縄コンベンションセンター
- ④浦木智央, 下所和弘, 石丸伊知郎, 光圧力駆動微粒子によるマイクロ流体粘性計測技術, 2008年度精密工学会秋季大会学術講演

会 2008年9月17日, 東北大学

- ⑤浦木智央, 下所和弘, 合谷祥一, 末吉紀行, 石丸伊知郎, 光圧力駆動型多自由度マイクロプローブによる粘弾性力計測技術, 知能メカトロニクスワークショップ, 2008年9月8日, 高松サポート
- ⑥ K. Gesho, T. Uraki, I. Ishimaru, Study on floating micro-probe with multi degrees of freedom and function for cell operation -Juggling probe-, SPIE Optical Micromanipulation V, 2008年8月11日, サンディエゴコンベンションセンター
- ⑦浦木智央, 下所和弘, 石丸伊知郎, 浮遊型マイクロプローブによる生体細胞の粘弾性力計測技術, 2008年度精密工学会春季大会, 2008年3月17日, 明治大学
- ⑧T. Uraki, K. Gesho, I. Ishimaru, Light pressure driven floating-type micro-probe technology for operation of biological cell, 7th France-Japan congress on Mechatronics, 2008年5月21日, サボアコンベンションセンター
- ⑨下所和弘, 山本量也, 近藤昌博, 原田伯城, 石丸伊知郎, 生きたままの単一細胞特性計測のためのマイクロプローブ非接触振動制御技術, Optics Photonics Japan 2007, 2007年11月10日, 一橋会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石丸 伊知郎 (ISHIMARU ICHIROU)
香川大学・工学部・教授
研究者番号: 70325322

(2) 研究分担者

正木 勉 (MASAKI TSUTOMU)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 30335848

田中 直孝 (TANAKA NAOTAKA)
香川大学・農学部・准教授
研究者番号: 30335848

(3) 連携研究者

竹川 薫 (TAKEKAWA KAORU)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号: 50197282

栗山 茂樹 (KURIYAMA SHIGEKI)
香川大学・医学部・教授
研究者番号: 50244710