

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012 ～ 2012

課題番号：24860032

研究課題名（和文）

環境制御型電子顕微鏡内でのナノロボットを用いた単一細胞自動解析システム

研究課題名（英文）

Automatic Single Cell Analysis System inside ESEM

研究代表者

申 亜京 (SHEN YAJING)

名古屋大学・工学研究科・COE 研究員

研究者番号：20637508

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまで、環境制御型電子顕微鏡（Environmental Scanning Electron microscope: ESEM）と呼ばれる、走査型電子顕微鏡（SEM）を発展させた特徴的な顕微鏡を用いてナノマニピュレーションシステムを構築してきた。これにより、湿潤状態で直接にバイオ試料を観察することができる。本研究では、環境制御型電顕内でのナノマニピュレーションを基として、単一細胞解析ことに注目する。単一細胞解析のために、環境制御型電子顕微鏡内でのナノマニピュレータの自動化システムの構築を行う。

研究成果の概要（英文）：

In this research, an automatic single cell analysis system using micro/nano tools and nano robot inside an environmental scanning electron microscope (ESEM) is proposed. In this research, we propose the single cell analysis based on micro/nano tool and nano robot inside ESEM. Moreover, we will develop an automatic system for the single cell analysis. Therefore, any researchers can use this system easily, and a series of single cell analysis tasks can be performed accurately at nano scale. This system provides us a novel method to get accuracy information of single cell, which will help us to understand the cell mechanism better. It will benefit the biological and medical fields, such as single cell surgery and new drug development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2012年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：マイクロ・ナノ システム工学

科研費の分科・細目：機械工学・知能機械学・機械システム

キーワード：ナノロボット、単一細胞解析

1. 研究開始当初の背景

集団細胞解析に基づく手法では、統計的な結果しか得ることが出来ない。このため、統計的な評価が困難な場合や実験条件によっては評価結果を十分に得ることが困難

である[1]。また、多くの病気（例えば、癌）が単細胞から始まる時からの早期診断は個々の細胞を解析することを必要とする。したがって、近年、単一細胞を詳細に解析するための単一細胞解析の手法が注目されてい

る。

2. 研究の目的

従来、我々は ESEM 操作目的の自由 7 度とナノロボットシステムを開発した。これは、広作業領域と多くの作業自由度による効果的な試料の観察と操作を実現した。さらに、環境温度と湿度が ESEM チャンバー内の冷却段階で制御することが出来る。本システムにより、例えば、単一のイースト細胞の機械的および電気的特性を計測することに成功した。

しかし、これまでのシステムでは、作業は手動操作で行ってきた。このため、常に長時間の作業時間が必要であり、効率的な細胞解析が困難であった。一方で、自動化技術により、様々な場面で、産業界も含め、様々な恩恵を受けている。本研究では、我々が提案してきた環境制御型電顕内でのナノマニピュレーションを基として、単一細胞解析を自動化することに注目した。

3. 研究の方法

この研究は、2 つの部分に分かれています。最初のもは、単一細胞解析のための機能的マイクロ/ナノツールを設計し、製造することである。第二部分は自動移動制御を含むナノロボット操作システムの開発。我々は、コンピュータと情報技術を細胞分析システムに統合し、画像処理をもちいてナノロボットを制御する。最後に、この 2 つの部分は統合される。精密的な単一細胞解析は自動的に実現する。

(1) 機能化のマイクロ/ナノツールの開発とナノロボット制御。マイクロ/ナノツールは、AFM カンチレバーから製造されている。主要な製造プロセスに集束イオンビームエッチングとデポジションです。この方法は、ナノスケールでの精密なツールを作製することができます。ナノマニピュレータは、3 つの自由度 (X, Y, Z) を有し、ナノナイフをエンドエフェクタとして用いることが出来る。作業を ESEM のリアルタイム画像上を得ることにより、ナノツールと対象細胞を検出することが出来る。これにより、自動的にナノナイフを移動させ、単一細胞に位置決めする手法を提案する。細胞は、というように細胞膜の剛性、電気特性、pH 値、温度、などの多くの特性を持っています。従って、細胞の状態は、これらの特性の測定により同定することができる。我々は、細胞測定用センサーの 2 種以上を組み合わせたい。その他、本研究では、Visual C を基にしたヒューマン、インタフェース、コントロール、ダイアログに統合する。自動化システムを用いて効率的な作業を行うことが出来ると考えられる。

(2) 単一細胞解析のシステム統合。マ

ルチセンサ、システムと自動制御システムを含めて、一緒に上記の技術を統合しました。我々はシステムをテストするために酵母細胞を使用しました。細胞は、私たちのシステムに入れられ、そして細胞分析を行うことができます。例えば、単一細胞の分離、特性評価など。

4. 研究成果

(1) 環境制御型電子顕微鏡内でのバイオナノマニピュレータシステム

図 1 (a) は ESEM の写真を示し、図 1 (b) は ESEM 室内でのナノロボットマニピュレーションシステムの外観写真を示す。本システムは、全体で 3 つのユニットと 7 つの自由度を有する。ユニット 1 とユニット 2 はマニピュレーションシステムエンドエフェクタを 3 次元的に操作するためのナノマニピュレーションである。ユニット 1 は、三軸 (x, y, z) に対してそれぞれ 3 つピコモータアクチュエータ (ニューフォーカス社) によって駆動する本ピコモータは、最小で約 30nm のステップ移動を行うことが出来る。インテリジェントピコモータジョイスティック (ニューフォーカス社) を用いることで、ピコモータの移動速度を設定することが出来、自動制御時の特定の速度を設定した。細胞試料の温度は、温度制御冷却ステージ (ユニット 3) によって調整し、試料温度 (0-40°C) と試料室圧力 (10-2600Pa) をコントロールすることによって、周囲の湿度 (最大 100%) を設定することが出来る。

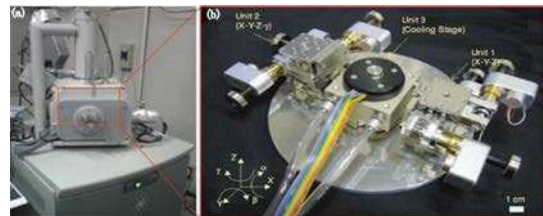


図 1 ESEM と ESEM 室内でのナノロボットマニピュレーションシステム

本実験では、ユニット 1 はエンドエフェクタの位置決めのために用いた。また、ユニット 3 を単一細胞試料の位置決めのために用いた。図 2 は、組立座標とナノマニピュレータ (ユニット 1) の運動学パラメータを示す。基板部分は座標 0 として定義した。この時、座標 0 と座標 1 が一致するとした。座標 1 は、座標 0 から $|Z_0|$ 軸方向の並進運動により得られる。座標 2, 3, 4 は座標 1 の相対的に移動することで得られる。座標 2 は $|Y_0|$ 軸上の並進運動により得られるため座標 2 の運動は、座標 1 に影響を与えずに、一緒に座標 3 と 4 に影響を与えることになる。同様にして、座標 3 は、 $|X_0|$ 軸上で並進運動により得られ座標 1 と 2 の運動に影響を与えることなく、また座標 4 の運動に影響を与える

ことによる。座標 4 は、ツール・自身の座標を示す。座標 i には座標 $i-1$ からオフセットがあるため、それぞれ三次元 $X_{i-1, i}, Y_{i-1, i}, Z_{i-1, i}$ に沿った $X_{i-1}, Y_{i-1}, Z_{i-1}$ によって記述されるこれらの値は、マニピュレータの設計によって決定される定数であり、立方領域は、エンドエフェクタの作業領域を示す。イースト細胞は、別の座標系を有する試料ステージに設置される。以上に基づいて、エンドエフェクタは、ナノマニピュレータによって駆動され単一細胞を操作することが出来る。

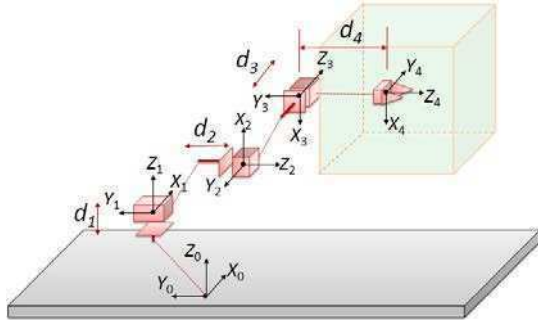


図 2 は、組立座標とナノマニピュレータ（ユニット 1）の運動学パラメータ

すべての 4 つのリンクの変換行列は、各々の関連の均一な変化によって記述されることが出来る。そして、それは以下によって示される：

$${}^0T_4 = {}^0T_1 {}^1T_2 {}^2T_3 {}^3T_4 = \begin{bmatrix} 0 & 1 & 0 & p_x \\ 0 & 0 & -1 & p_y \\ -1 & 0 & 0 & p_z \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

$$p_x = Lx_{01} + Lx_{12} - Ly_{23} + Lz_{34} + d_3$$

$$p_y = Ly_{01} + Ly_{12} - Lz_{23} + Ly_{34} - d_2 - d_4$$

$$p_z = Lz_{01} + Lz_{12} + Lx_{23} - Lx_{34} + d_1$$

$Lx_{(i-1)(i)}, Ly_{(i-1)(i)}$ と $Lz_{(i-1)(i)}$ ($i=1, 2, 3, 4$) は定数である。彼らは、それぞれ x_{i-1}, y_{i-1} と z_{i-1} に沿って座標 $i-1$ から座標 i のオフセット距離を示す。 d_1, d_2 と d_3 は 3 つピコモータの並進運動を示す変数の値である。 d_4 はエンドエフェクタのサイズによって決定した定数である。

(3) イースト細胞の試料準備

本研究では、野生型のイースト細胞 (*W303*) を用いた。細胞の直径は 3-6 μm 程度である。まず、イースト細胞を、30°C 保育器の下で 48 時間培養する。その後、イースト細胞を純粋により懸濁させ、この溶液を数滴試料ステージ上に滴下する。試料ステージとして、タングステン材料のプロープを用いた。タングステンプロープは試料冷却ステージに固定。ESEM は、高解像度で水を含む試料の直接の観察することが出来る。図 3

(a) および (b) に E-SEM によりイースト菌を観察した結果を示す。図 3 (a) は、上部から撮影した写真であり、図 3 (b) は側面から撮影した写真である。イーストの結果から E-SEM 観察条件下では、イースト細胞はほぼ球形形状を保っていることが分かる。

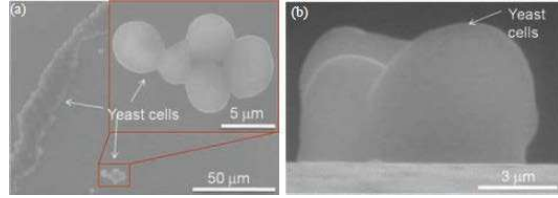


図 3 E-SEM によりイースト菌を観察した結果
(3) 実験システムの構成とセットアップ

単一細胞の切断実験の概略図を図 4 に示す。イースト細胞は、2.2 節で述べた手法により、試料ステージ上に固定した。一方で、ナノナイフは、ナノロボットマニピュレータ上にエンドエフェクタとして取り付けられた。これらは対向するように設置された。細胞を切断時に、E-SEM 観察によりナノナイフに設置した応力計測用のビームの変形を計測することが必要である。これにより、最大切断力はばね定数とナイフビームの変形に基づいて、フックの法則を用いて計算することが出来る。細胞切断が終わった後にナノナイフはナノマニピュレータによって駆動される次のセルに自動的に移動する。図 5 は、ESEM 内の自動操作システムのハードウェアの構成を示すフィードバックモジュールは、システムの制御輪を構築するためにビデオキャプチャカードを使用した。

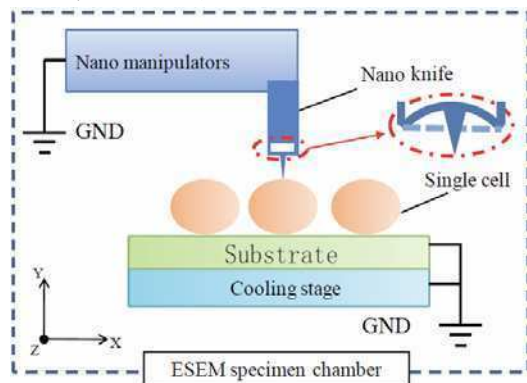


図 4 単一細胞の切断実験の概略図

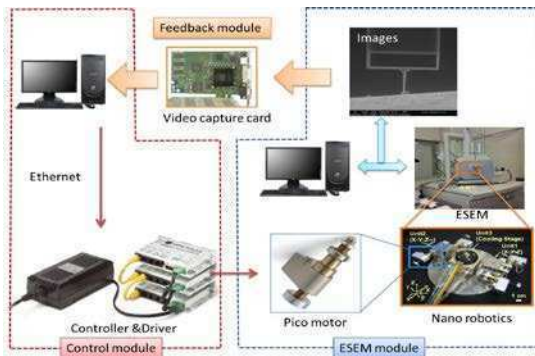


図5 ESEM 内での自動操作システムのハードウェアの構成

自動制御のフローチャートを図6に示す。まず、リアルタイムの画像が ESEM システムから得る次に、エンドエフェクタと細胞の位置を、画像処理に基づいて認識する。これら2つの位置情報の差分をナノマニピュレータの移動方向を制御する信号として使用する。最終的には、エンドエフェクタは、自動的に位置情報に基づいてナノロボットマニピュレータによって駆動される細胞に移動して位置決めされる。位置決め後に更新された画像は、エンドエフェクタの新しい位置を計算するために用いられる。

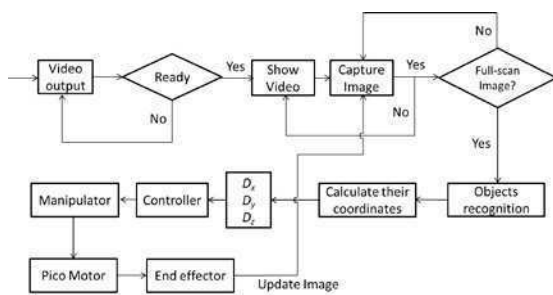


図6 自動制御のフローチャート

図7に示すように、これらの機能はすべて、Visual C を基にしたヒューマン・インタフェース・コントロール・ダイアログに統合した。ダイアログの左側には、画像処理でリアルタイム・ビデオとイメージを示している。右側には、命令ボタン（すなわち、ビデオ・キャプチャー、画像処理とモータ制御）をリストアップした。以下のセクションでは、これらの機能の詳細について述べる。

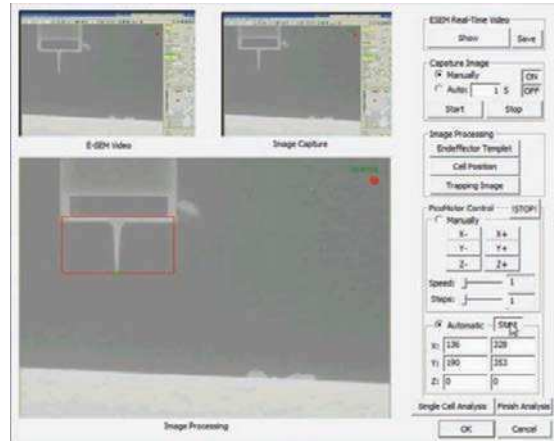


図7 ヒューマン・インタフェース・コントロール・ダイアログに統合システム

(4) ESEM の画像処理手法

図8 (a) (b) に示すように、メディアンフィルタは、ESEM 画像のノイズを低減するために使用した。本手法は、画像ノイズをフィルタで低減させることができる。その後、エンドエフェクタは、テンプレート・マッチング技術を用いて識別する。例えば、図9 (a) に示すように、ナノナイフの先端部分を解析の範囲として指定することで、図9 (b) に示すように、ナノナイフの先端部を検出することが可能である。以上の実験結果から、実験的に提案手法により、ナノナイフを識別し、またナノナイフの先端部を検出することが可能であることを確認した。

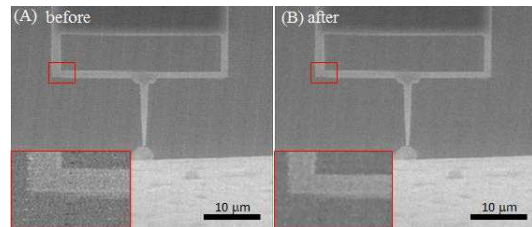


図8 メディアンフィルタは、ESEM 画像のノイズを低減するために使用した

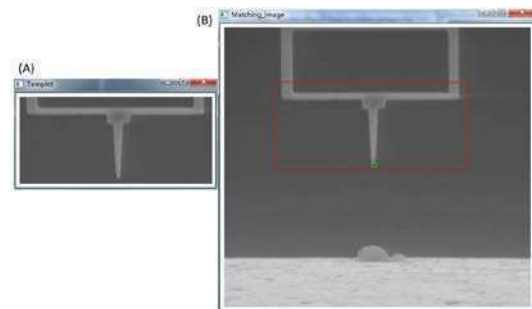


図9 ナノナイフの先端部を検出

イースト細胞は、基板上に接着した際に、ファンデル・ワールス力により、半円形状となる場合はある。これは、細胞のサイズにより依存していると考えられる。このため、細胞を単純にテンプレート・マッチングによ

り検出することは困難である。さらに、細胞とエンドエフェクタに接触する際、その作業内容により、細胞に変形が起こるなど、作業に依存すると考えられる。例えば、細胞壁の剛性を評価する場合、たとえば、観察の興味となる領域は、細胞とエンドエフェクタが接触した周辺部分が観察領域となる。しかし、一方で、例えば、細胞と基板間の剪断接着力を評価したい場合に観察領域は、細胞の断面部分全体である。したがって、我々は細胞の認識に関しては、利便性を考慮し、本研究では、人が画面をマウス操作により、観察領域を指定する手法とした。以上の方法によりより自動化システムを用いて効率的な作業を行うことが出来ると考えられる。

(5) ナノマニピュレータの位置制御

三軸方向のナノマニピュレータの移動は、それぞれ3ピコモータドライバによって制御されるが、この時、3つのモータを同時に移動することが出来る。ピコモータは2種類の運動モードがある(ステップ・モードと速度モード)。自動移動制御では、エンドエフェクタおよび細胞間の距離から、停止フラグ値をセットする制御信号として用いた。この距離がゼロとなった時、ナノマニピュレータに停止フラグが立ち、停止することとなる。したがって、ナノマニピュレータは、細胞とエンドエフェクタが接触するまで自動的に移動することとなる。

エンドエフェクタと単一の細胞間の距離は、画像に基づいて計算することが出来る。まず、片持ち梁の幅を画像により計測する。次に、移動距離をピクセルデータとして計算する。最後に、エンドエフェクタと単一細胞間の距離をリアルタイムで差分を取りながらナノマニピュレータを移動させる。

本実験では、ピコモータの移動速度は0~20 $\mu\text{m/s}$ の範囲で設定した図10に示すように、移動時間を削減するために、エンドエフェクタと単一の細胞間の距離が遠く30 μm よりであるとき、移動速度は最大値20 $\mu\text{m/s}$ に設定されている。この時のエンドエフェクタの片持ち梁の幅は30 μm である。一方、位置決め精度を確保するために、両者の距離が5 μm より少ないとき、速度を1 $\mu\text{m/s}$ にセットする距離が5 μm に30 μm の間にあるとき、運動速度は線形に減少させた。

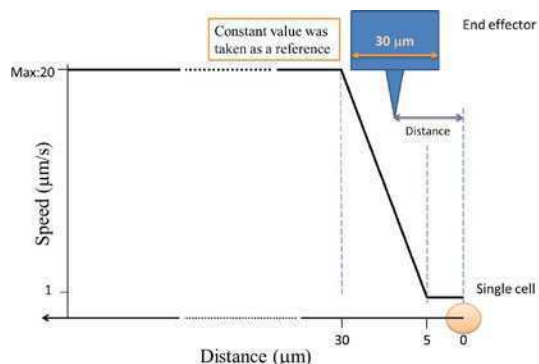


図10 ピコモータの移動速度の設定

(6) 単一細胞解析：単一細胞の切断実験

単一細胞の切断実験は自動操作システムに基づいたフローチャートに従って行った。図11は、エンドエフェクタの自動移動中に撮影した画像を示している。ナノナイフの先端が認識され、緑色の丸でマークで示された。ナノマニピュレータが、位置情報により計算されたように自動的に細胞に向かって移動した。その後、手動操作により、単一細胞の切断実験を行った。図12(a)(b)は、単一細胞の切断の例を示している。ナノナイフのビームの変形はESEM画像からはっきりと見る事が出来る。したがって、最大切断力がナイフビームの変形に基づいて、フックの法則を用いて算出することができ、本実験結果から、最大切断力は約30 μN であった。

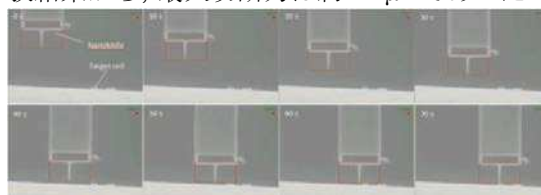


図11 エンドエフェクタの自動移動中の画像

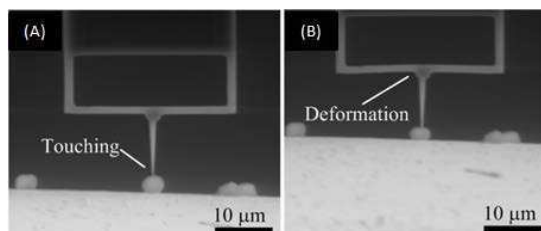


図12 単一細胞の切断の例

本研究では、単一細胞解析のために、環境制御型電子顕微鏡内でのナノマニピュレータの位置自動制御システムを構築した。ナノマニピュレータに固定したナノツールをエンドエフェクタとして、単一細胞へ自動的に接触させた。生物試料としてはイースト細胞を用いて、ナノツールとしては、ナノナイフを用いた。ESEMのリアルタイムの画像にメディアンフィルタで画像ノイズを除去した上で、テンプレート・マッチングにより、ナノナイフ及びナノナイフの先端部を検出した。E-SEMの画像情報に基づいて、ナノマ

ニピューレータの動きを制御し、ナノナイフを用いた単一細胞の切断実験を行った。提案した自動位置決め手法により、単一細胞をナノナイフにより切断することができ、提案手法の有効性を実験的に示した。今後の課題は、単一細胞の切断まで含めたトータルでの自動化システムの構築を行う。

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2件)

① Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zhan Yang, Hiroataka Tajima, Zoran Najdovski, Michio Homma and Toshio Fukuda, “Nano-needle for Individual Cell Stiffness Determination at Various Humidity Conditions by Nano Manipulation”, Nanotechnology, Accepted, 査読有.

② Chengzhi Hu, Carlos Tercero, Seiichi Ikeda, Masahiro Nakajima, Hiroataka Tajima, Yajing Shen, Toshio Fukuda, Fumihito Arai, “Biodegradable porous sheet-like scaffolds for soft-tissue engineering using a combined particulate leaching of salt particles and magnetic sugar particles”, Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, in Press, 査読無.

[学会発表] (計4件)

① Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Chengzhi Hu, Tao Yue, Hiroataka Tajima and Toshio Fukuda, 3D Cell Assembly based on Electro Deposition of Calcium Alginate, MHS 2012, Nagoya, Japan, Nov. 4-7. 2012.

② Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Michio Homma and Toshio Fukuda, Auto Nanomanipulation System for Single Cell Mechanical Property Characterization inside an Environmental SEM, IROS 2012, Vilamoura, Portugal, Oct. 7-12. 2012.

③ Yajing Shen, Masahiro Nakajima, and Toshio Fukuda, Auto Nanomanipulation System for Single Cell Stiffness Measurement, RSJ 2012, Sapporo, Japan, Sept. 17-20. 2012.

④ Yajing Shen, Masahiro Nakajima, Zhan Yang, Michio Homma and Toshio Fukuda, Nano Needle with Buffering Beam for Single Cell Stiffness Measurement by Nanorobotic Manipulators inside ESEM, IEEE Nano 2012, Birmingham, UK, Aug. 20-13. 2012.

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

申 亜京 (SHEN YAJING)

名古屋大学・工学研究科・COE 研究員

研究者番号: 20637508

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし